جامعة دمشق
كلية الزراعة
قسم علوم الأغذية

Syrian Atomic Energy Commission

مقارنة طريقة الـــ API مع الـــ PCR في التعرف على الـــ *Salmonella* في منتجات الفروج و البيض في مدينة دمشق و ريفها

Comparison between API method with PCR in detection of *Salmonella* in chicken and eggs products in Damascus city and its country side.

رسالة جامعية أعدت لنيل درجة الماجستير في علوم الأغذية

إعداد الطالب
م. بسام أنطون ملص

بإشراف

د. صباح يازجي **د. أيمن المريري**

2010

تصريح

قدمت هذه الدراسة استكمالاً لمتطلبات الحصول على درجة الماجستير فـــي قـــسم علـــوم الأغذية من كلية الهندسة الزراعية – جامعة دمشق وهي بعنوان " **مقارنة طريقة الـــ API مـــع الـــ PCR في التعرف على السالمونيلا في منتجات الفروج والبيض في مدينة دمشق وريفهـــا**" وهذه الدراسة لم يسبق أن قدمت للحصول على أية درجة جامعية أخرى ولا هـــي مقدمـــة حاليـــاً لذلك، وأن كافة الأعمال والنتائج المذكورة هي محصلة جهود شخصية وبتوجيه مـــن المـــشرفين العلميين. وإن أية معلومات أو طرائق أو نتائج أخرى ذكرت في هذه الرســـالة قـــد نـــسبت إلـــى مصادرها ومؤلفيها بوضوح في النص وفي قائمة المراجع.

المرشح: م. بسام ملص

Declaration

This study has been offered to achieve Master degree in food science department from faculty of agriculture – Damascus university, and its title is "**Comparison between API method with PCR in detection of Salmonella in chicken and eggs products in Damascus city and its country side**". This study didn't offer to achieve any other college degree, and all the efforts and results are resulted from individual work under supervision of the scientific supervisors. Any information, methods or results mentioned in this study have been assigned to its recourses and researchers in the text and in references list.

Candidate: E. Bassam Malas.

إهــداء

إلى القلب العطوف و الحنون
إلى من قدم لي النصح والمشورة
إلى قدوتي و مثلي الأعلى

أبي الحبيب

إلى نبع المحبة والحنان
إلى من ضحَت من أجلي
إلى أغلى من في الوجود

أمي الغالية

إلى من وقف إلى جانبي وساندني في كل الأوقات
إلى من أحبهم واعتز وافتخر بهم

إخوتي: إحسان، محاسن، إيلادس.

إلى أخي وصديقي
إلى توأمي الذي أحب

أخي وسيم

إلى من أثبتت لي الأيام صدق محبتهم و إخلاصهم
إلى كل من يستحق التقدير و الاحترام

أصدقائي

إلـــــى كـــــل مـــــن ســـــاهم بنجـــــاح هـــــذا العمـــــل المتواضـــــع

شكر وعرفان

بكل الاحترام أتقدم بوافر الشكر والتقدير لعمادة كلية الزراعة ورئاسة وأعضاء قسم علوم الأغذية في كلية الزراعة - جامعة دمشق، وأخص بـــالاحترام والعرفـــان بالجميل لأستاذي: **الدكتورة صباح يازجي والدكتور أيمن المريري** اللـــذين تفـــضلا بالإشراف على هذه الرسالة، كما أحاطاني بالرعاية العلمية الواسعة.

و أتوجه بالشكر الجزيل إلى الأستاذ الدكتور دارم طباع و الدكتور عبد الحكيم عزيزية على النصائح والتوجيهات التي قدموها.

وخالص تقديري وامتناني للدكتورة عهد أبو يونس لوقوفهـــا بجـــانبي لإتمـــام المشوار. وإلى كافة موظفي دائرة التقانة الحيوية والبيولوجيا الجزيئية فـــي الطاقـــة الذرية الذين سخروا كل الإمكانات لإنجاز هذا البحث، كما أتقدم بالشكر والعرفان إلى أصدقائي في مديرية المخبر المركزي وأصدقائي في كلية الهندسة الزراعية.

و أخص بالشكر أهلي الذين كانوا إلى جانبي في جميع المحن التي مررت بها.

كما أدين بالشكر لكل من قدم لي المعونة والمشورة عن طيب خاطر

بسام ملص

محتويات الرسالة

قائمة الجداول

قائمة الأشكال

قــائمـــة المختصـــرات

اختبار الكشف عن الــ *Salmonella* على وسط (*Salmonella Shigella* Agar)	SS
اختبار الكشف عن الــ *Salmonella* على وسط (Bismuth Sulphite Agar)	BA
اختبار الكشف عن الــ *Salmonella* على وسط (Hektoen Agar)	HA
اختبار الكشف عن الــ *Salmonella* على وسط (Triple Suger Iron Agar)	TSI
اختبار أحمر الميتيل	MR
اختبار فوكس بروسكار	VP
اختبار (O-Nitrophenyl – β-D- galactopyranoside)	ONPG
اختبار تفكيك الأرجنين	ADH
اختبار تفكيك الليزين	LDC
اختبار تفكيك الأورنثين	ODC
اختبار سيمون سيترات	CIT
اختبار انتاج غاز كبريت الهيدروجين	H2S
اختبار تفكيك اليوريا	URE
اختبار تفكيك التربتوفان	TDA
اختبار الأندول	IND
اختبار تفكيك الجيلاتين	GEL
اختبار تخمير سكر الغلوكوز	GLU
اختبار تخمير سكر المانيتول	MAN
اختبار تخمير سكر الإنوسيتول	INO
اختبار تخمير سكر السوربيتول	SOR
اختبار تخمير سكر الرامنوز	RHA
اختبار تخمير سكر السكروز	SAC
اختبار تخمير سكر الميليبيوز	MEL
اختبار تخمير سكر الأميغدالين	AMY
اختبار تخمير سكر الأرابينوز	ARA
شفع أسي base pairs	Bp
Association of Official Analytical Chemists	AOAC
Deoxy Nucleotide Triphosphate	DNTP
Deoxyribonucleic acid	DNA
Ethylene dimitrotetra acetic acid	EDTA
Food and agriculture organization	FAO
Polimrase Chain Reaction	PCR

Tris EDTA	TE
Micro liter	μl

الملخص

أُجري البحث في عامي (2007 – 2008) في مخبر التقانة الحيوية التابع لهيئة الطاقة الذرية والمخبر المركزي التابع لوزارة الاقتصاد والتجارة. هَدَفَ إلى عزل وتصنيف البكتيريا التابعة لجنس الـ *Salmonella* من الفروج والبيض وبعض منتجاتهما، وذلك باستخدام طرائق العزل والتشخيص التقليدية وتقنية الـAPI، و مقارنتها مع تلك المعتمدة على المادة الوراثية DNA (تقنية الـPCR)، بغية التوصل إلى أفضل طرائق الكشف عن الـ *Salmonella* و تحديد دقتهما. بينت النتائج أن أعلى نسبة لتواجد الـ *Salmonella* كانت في أحشاء الفروج (60%)، وبفروق معنوية على مستوى ثقة 95% في حين انخفضت نسبة تواجدها إلى 10% في كل من الجناح والشاورما. ولم يلاحظ تواجد لهذه البكتيريا في القوانص، كما أظهرت النتائج ارتفاع نسبة تواجد هذه البكتيريا في منطقتي الزبلطاني وكشكول (66.66 و60% على التوالي)، بينما انخفضت النسبة وبفروق معنوية في منطقتي الدويلعة والتل (16.6 و20% على التوالي). ولم يلاحظ تواجد الـ *Salmonella* في العديد من المناطق مثل باب توما وقدسيا. ارتفعت نسبة تواجد هذه البكتيريا في فصل الصيف (33.33%) بفروق معنوية بالمقارنة مع فصل الشتاء حيث سجلت أقل نسبة تواجد (9.09%). لم يتم تسجيل تواجد للـ *Salmonella* في عينات البيض و الكعك الإسفنجي المأخوذة من منطقتي دمشق و ريفها. بلغت النسبة الكلية لتواجد الـ *Salmonella* في عينات الفروج المأخوذة 41% في مناطق مدينة دمشق وريفها. تم تحديد نوعين من الـ *Salmonella* هما *Salmonella* arizonea و *Salmonella paratyphi A* باستخدام تقنية الـ API. توافقت نتائج الكشف عن الـ *Salmonella* بين تقنيتي الـ API والـ PCR في 97% من العزلات المدروسة.

الكلمات المفتاحية: الـ *Salmonella*، الفروج، المناطق، الفصول، PCR، API .

Abstract

This investigation was carried out during (2007 – 2008) in biotechnology laboratory\ atomic energy, and the central laboratory\ ministry of economy and trade. In order to isolate and classify *Salmonella* bacteria from chicken, eggs and some of their products, by using conventional methods and API technique, and compare it with methods depend on DNA (PCR technique), to identify the best method for detection of *Salmonella* and identify there accuracy. Results showed that the highest percentage of *Salmonella* was in poultry's guts (60%), with significant differences with either wings or Alshawrma where the percentage was decreased to 10% at confidence level 95%. There was not any existences of *Salmonella* in gizzards. Results showed that there was increasing in *Salmonella* percentage in Alzablatani and Kashkol (66.66 and 60% respectively), while it decreased with significant differences in Dwelaa and Altal (16.6 and 20 % respectively). There was not any existences of *Salmonella* in many places such as Bab Toma and Kudsia. The percentage of *Salmonella* was increased in summer (33.33%), with significant differences comparing with winter (9.09%). There wasn’t any *salmonella* bacteria in egg and cake in taken samples from Damascus and Damascus countryside. Also the study showed that the total existence percentage of *Salmonella* in the studied chicken samples was 41% in Damascus city and its countryside. Two *Salmonella* kinds were identified, *Salmonella arizonea* and *Salmonella paratyphi A*, by using API technique. The agreement of API and PCR results was in 97% of studied isolations.

Key Words: *Salmonella*, poultry, places, seasons, API, PCR.

المقـــدمــــــة

Introduction

أولاً: مقــدمة Introduction

تؤدي التغذية الجيدة للمحافظة على الصحة فالطعام يزودنا بالعناصر الغذائية اللازمة لبناء الجسم ولا بد أن يكون الغذاء المتناول سليماً وصحياً ويقصد بذلك خلوه من جميع عوامل التلوث الميكروبيولوجي البيئي التي تحول الغذاء إلى مادة ضارة لصحة الإنسان. يبدأ تلوث الغذاء من التربة والمياه مروراً بالحيوانات والحشرات وعمليات تحضير الغذاء وحفظه وتداوله، وتنتهي بالإنسان نفسه، لذلك فإن المراقبة المستمرة والمتكاملة ضرورية من أجل الإقلال من حالات التسمم الغذائي. وقد قام الباحثون بدراسات كثيرة حول البكتيريا الممرضة المنتقلة عبر الغذاء والبحث عن طريقة للتخلص منها ومن أهم البكتيريا التي تنقلها الأغذية الملوثة والتي لها قدرة على إحداث المرض هي الـــ *Salmonella*، حيث تعتبر اللحوم بشكل عام ولحوم الدواجن والخنازير بشكل خاص مصدر رئيسي لها، وهنالك حوالي 30000 حالة في الولايات المتحدة الأمريكية مؤكدة سنوياً نتيجة الإصابة بمرض Salmonellosis، وفي عام 2003 تم الإبلاغ عن 11000 حالة في كندا. أما في سورية وحسب وزارة الصحة السورية، فقد بلغت نسبة الإصابة بالحمى التيفية عام 2000 في المستشفيات الحكومية السورية في كل المحافظات 10159 حالة، علماً أن هذا العدد يمثل ثلث الحالات الحقيقية في القطر بحسب ما أورده المركز الوطني للمعلومات السمية في تقريره عام 2002.

نظراً لأهمية هذه البكتيريا وقدرتها على إحداث المرض، سعت الدراسات الحديثة لتطوير أنظمة المراقبة الروتينية للغذاء والبيئة للكشف عن بعــض الأحيــاء الدقيقــة الممرضــة كالـــــ *Salmonella*، مع الاعتماد على أن تكون دقيقة وحساسة وسريعة. كما أن هنالك ســعي لتــدعيم الاختبارات التي تعتمد على التقنيات الجزيئية مع تلك التي تعتمــد علــى الاختبــارات الحيويــة الكيميائية بالرغم من الاعتماد على الخصائص الحيوية الكيميائية تحتاج لفترة 3 – 7 أيام وهــذا لا يساعد في الكشف المبكر عن تواجد الـــ *Salmonella*.

نظراً لعدم توفر دراسة عن تواجد الـــ *Salmonella* في محافظة دمشق و ريفها، هَدَفَ البحث إلى عزل وتصنيف البكتيريا التابعة لجنس الـــ *Salmonella* من الفروج والبيض وبعض منتجاتهما، وذلك باستخدام طرائق العزل والتشخيص التقليدية وتقنية الـــ API، و مقارنتها مع تلك

المعتمدة على المادة الوراثية DNA (تقنية الـــ PCR)، بغية التوصل إلى أفضل طرائق الكشف عن الـــ *Salmonella* و تحديد دقتهما.

الدراسة المرجعية

Literature Review

ثانياً: الدراسة المرجعية Literature Review

2 - 1 – لمحة تاريخية: Historical background

يعد العالم Budd أول من أكد أن العامل المسبب للحمى التيفية من الممكن أن ينتقل عبر الغذاء وذلك من خلال دراسته التي أجراها عام 1874 (Sackey *et al.*, 2001). وفي عام 1880 قام العالم Eberth بعزل العامل المسبب للحمى التيفية من العقد اللمفاوية وطحال مريض توفي نتيجة الإصابة بهذه الحمى، ودعاها باسم Typhi (عبيد،1997)، وبعد عدة أعوام أكد العالم Gaffky أنه العامل نفسه المسبب للمرض عند الخنازير (D'Aoust, 1989). إلا أن الدراسات حول تصنيف هذا العامل تمت من قبل العالمين Salmon و Smith عام 1885. وفي عام 1888 كان Gartner أول من عزل *S. enteritidis* من اللحم التي سببت 57 حالة تسمم غذائي (Alban *et al.*, 2002).

2 -2 – تسمية الـ *Salmonella* : Naming of *Salmonella*

قام العالم Lignieres في عام 1900 بمجموعة من الأبحاث والدراسات أفضت إلى تسمية جنس الـ *Salmonella* نسبة للعالم Salmon إكراماً لعمله في عزل وتصنيف سالمونيلا كوليرا الخنازير *S. cholerasuis* عام 1885 (غنيم، 1996)، ومن ثم دأب Lignieres على دراسة الأنماط المصلية (Le Minor, 1984)، وجاء التصنيف الأول لجنس الـ *Salmonella* بناءً على الأنماط المصلية التي درسها العالم Kuffman عام 1941، وحالياً تم اكتشاف حوالي 2500 نمط مصلي (Brown *et al.*, 1996).

2 – 3 – تصنيف الـ *Salmonella*: Classification of *Salmonella*

يتبع جنس الـ *Salmonella* لعائلة *Enterobacteriaceae* (Sackey *et al.*, 2001)، يتواجد أفراد هذا الجنس في المنطقة المعوية للإنسان والحيوان مسببة الأمراض (LeMinor, 1984). وقد اعتمدت الدراسات التصنيفية الأولى التي ظهرت حول الـ *Salmonella* على مقدرة هذه البكتيريا على تخمير السكريات والتفاعلات الاستقلابية الأخرى

التي تقوم بها، إضافة إلى الخواص الشكلية والقــدرة علـــى إحــداث المــرض (Schmith and Rodrick, 2003). هنالك العديد من الطرائق التصنيفية للـــ *Salmonella* منها:

أ - **طريقة Ewing**: تعتمد على الأنماط المصلية، حيث قُسم جنس الـــــ *Salmonella* إلـــى ثلاثة أنواع (*S. typhi* – *S. choleraesuis* – *S. enteritidis*) وحسب هذه الطريقـــة يوجــد نمط مصلي واحد في كل من النوعين الأولين وحوالي 1500 نمط مــصلي فـــي النـــوع الثالـــث (Levinson and Jawetz, 2002).

ب - **طريقة Kaufman وWhite**: تعتمد هذه الطريقة على المستضدات، فعنــد دخـــول الـــ *Salmonella* إلى أنسجة الحيوان تنشط إعطاء استجابة نوعية، كل مستضد يحتـــوي عـــدد محدد من المجموعات المحـــددة تعطـــي نوعيـــة مناعيـــة للجـــزيء (Guthri, 1992). هنـــاك المستضدات الجسمية (O)، والمستضدات السوطية (H)، ومستضدات الفوعـــة (Vi) (Schmith and Rodrick, 2003). وحسب هذه الطريقة يتم تعين أسماء أنواع مختلفة لكل نمـــط مـــصلي، يوجد 1500 نوع مختلف، تسمى عادة باسم المدينة التي عزلت منها (Popoff *et al*., 2000).

من الممكن تقسيم الـــ Salmonella حسب **طريقة Kaufman وWhite** لنوعين: *S.enterica*، *S. bongor* ويقسم النوع *S. enterica* بدوره إلى ستة تحت أنواع، والتي تُعطى أسماء أو غالباً أرقاماً رومانية، حيث تميز بالاعتماد على التفاعلات الحيوية الكيميائية، ويظهر الجدول (1) إيضاح للستة تحت أنواع بحسب Guthri, 1992.

جدول (1) تحت أنواع النوع *S. enterica*

S. enterica subspecies	
I	*Enterica*
II	*Salamae*
IIIa	*Arizonae*
IIIb	*Diarizonae*
IV	*Houtenae*
VI	*Indica*

وجدت الدراسات الحديثة حالياً أكثر من 2500 نمط مصلي تابع لجنس الـــ *Salmonella*، منها حوالي 60% تنتمي إلى تحت النوع I، والتي تسبب 90% من الأمراض الناتجة عن الـــ *Salmonella* عند الإنسان (Guthri, 1992).

ج – **الطريقة السريرية**: تعتمد على الأعراض التي تسببها الــ *Salmonella*، وبالتالي تقسم الــ *Salmonella* سريرياً إلى ثلاث مجموعات:

1 – الأنماط المصلية التي تصيب الإنسان فقط: وهي الأكثر خطورة بين الأنواع، حيث تتــضمن *S. typhi, S. paratyphi A,B,C.*(Hui *et al*,. 1995).

2 – الأنماط المصلية المتكيفة مع المضيف: وتتضمن *S. abourtusequi* (الخيول) (Schmith and Rodrick, 2003)، و*S. cholerasuis* (الخنازير) (Wilcock and Schwartz, 1992)، و*S. abortusouis* (الأغنــام) (Schmith and Rodrick, 2003)، و*S. dudlin* (أبقــار) (Fang and Fierer, 1991)، و *S. pullorum , S. gallinarum* (دواجن) (Schmith and Rodrick, 2003)، و*S. arizonae* (الزواحــف) (Waterman *et al*., 1990) وقــد أكــدت الدراسات إمكانية تواجد هذه الأنواع في الأغذية.

3 – الأنماط المصلية غير المتكيفة مع مضيف محدد: يوجد منها الممرضة للإنــسان والحيــوان وتتضمن معظم الأنماط المصلية المنتقلة عن طريق الغذاء، وهي تضم أكثــر مــن 2500 نمــط مصلي موزعة على مجموعة تحت أنواع، تختلــف فيمــا بينهــا بمقاومــة الظــروف المحيطــة والمضادات الحيوية (Farmer, 1995).

إلا أن هذا التعريف يتوقف في كثير من الأحيان على تحديد الجنس عبر إظهار الحــالات السريرية والفشل في تحديد النوع وتحت النوع المسبب للحمى حيث أن الأعراض السريرية لكــل من *S. typhimurium* و*S. enteritidis* هي ذاتها من حيث إحداث حمى معوية مترافقــة مــع إسهالات (Chiu *et al*., 2005)، ومن الممكن أن تتواجد في شريحة كبيرة من الحيوانات المدجنة وغير المدجنة (Rubin and Weinstein, 1997).

وضعت الــ *Salmonella* منذ عام 1983، بالاعتماد على المادة الوراثية (DNA) (Levinson and Jawetz, 2002) ضمن عدة مجموعات (Farmer, 1995)، المجموعة الأولى تتضمن الأنماط المصلية الأساسية والمسببة للأمراض عند الإنسان (Popoff *et al*., 2000). أما المجموعات المتبقية فقد تم ضمها إلى تحت مجموعات للنوع *S.enterica*، وهذه الأنواع هي: *S. enterica subsp salamae* و*S.enterica subsp arizonae*، *S. enterica subsp diarizonae*، *S. enterica subsp houtenae* و*S. enterica subsp indica*. (Euzéby, 1999)، وبالرغم من استخدام هذه التسميات وتداولها من قبل الجهات العلمية لاعتمادها على طريقة المستضدات التي وضعها العالمان Kauffman وWhite إضافة إلى

الدراسات الوراثية المعمقة التي تمت على الأنواع التابعة لجنس الـ *Salmonella*، إلا أن هذه التسميات لم تعتمدها اللجنة الدولية لعلم البكتيريا (International Committee of Systematic Bacteriology) (Chiu *et al.*, 2005).

2 - 4 - خصائص جنس الـ *Salmonella*: Characteristics of *Salmonella*

تعد الـ *Salmonella* بكتيريا عصوية الشكل، قصيرة إلى متوسطة الطول، أبعادها تتراوح ما بين 3 – 4 ميكرون طولاً و0.5 – 1 ميكرون عرضاً، وموجبة الكاتالاز، وسالبة الأوكسيداز (Moore, 2003)، هوائية – لا هوائية اختيارية، غير متبوغة، وليس لها محفظة (عبيد، 1997)، تتلون بسهولة وهي سالبة الغرام، متحركة بواسطة أسواط محيطية ما عدا النوعين *S. pullorum, S. gallinarum*.

تقدر درجة الحرارة المثلى لنمو الأنواع التابعة لجنس الـ *Salmonella* بـ 37 ْم، كما يمكن لأنواع الـ Salmonella النمو عند درجة 10 ْم، وتتوقف عن النمو عند الدرجة 6.7 ْم، كما يمكن مشاهدة نموها عند درجة الحرارة 45.5 ْم، وينعدم نموها تماماً عند الدرجة 60 ْم (Moore, 2003).

يسبب نمو الـ *Salmonella* تعكر مرق الزرع بشكل متجانس مع تشكل غشاء رقيق على السطح (Schmith and Rodrick, 2003)، أما على الوسط الصلب المغذي فإن المستعمرات تكون بقطر 1.5 – 2 ملم، رطبة ملساء، منتفخة شفافة، لماعة، إلا أن هذه المستعمرات تتحول إلى خشنة بتكرار الزرع، كما تعطي *S. paratyphi B* مستعمرات يتراوح قطرها بين 4 – 8 ملم أما *S. abourtusequi* و *S. cholerasuis* و *S. abortusouis* تكون أقطار مستعمراتها 1 ملم (Parker *et al.*, 2002). وتتواجد الأنواع التابعة لجنس *Salmonella* في مجال من الـ pH يتراوح ما بين 4 – 9، وقد وجد أن الأنواع *S. thompson* و *S.typhimurium* أكثر مقاومة للحموضة من النوع *S. senftenberg* (Parker *et al.*, 2002) وعلى الرغم من عدم قدرة الأنواع التابعة لجنس *Salmonella* على النمو في الأوساط التي تقل درجة الـ pH فيها عن 4، إلا أنها تتواجد في بعض الأغذية. ويتوقف نشاط الـ *Salmonella* في درجة من النشاط المائي الأدنى لنموها وهي 0.93 عند درجة حرارة 30 ْم

سواء كان هذا النشاط المائي ناتجاً عن وجود ملح أم سكر (Gaillot *et al.*, 1997) ولا تقاوم تركيز ملح أعلى من 8%. في لحم الخنزير عند درجة الــ pH = 5 ودرجة حرارة تخزين 10 ْم، تنمو الــ *Salmonella* في وسط نسبة ملوحته 3.5 %، لكنها لا تنمو في تراكيز ملحية تزيد عن 5%، إلا أن مقدرتها على النمو والتواجد تتأثر أيضاً باختلاف درجة حموضة الوسط فقد دلت الدراسات على أن الــ *Salmonella* قادرة على التواجد في درجة حرارة تتراوح ما بين 20 – 30 ْ م بتركيز 8% من ملح كلوريد الصوديوم بدرجة حموضة 6.5 وذلك في قطعة من لحم الخنزير، لكن لا يحدث نمو عند درجة حرارة 10 ْم (Jay, 1996).

تعتبر الأنواع التابعة لجنس الــ *Salmonella* من العصيات التي لا تخمر اللاكتوز وتخمر الغلوكوز وبعض السكريات البسيطة الأخرى (كالمانيتول، الأرابينوز، السوربيتول، المالتوز، وغيرها)، وهي غير مخمرة للسكروز عدا النوع *S. arizonae* حيث أن الدراسات تؤكد أنه يحتوي على بلاسميد يعطي القدرة على تخمير السكروز (Polymenis *et al.*, 2004)، و ينتج عن عملية التخمر غاز وحمض كما أنها تنتج غاز الكبريت H_2S وتستطيع اختزال النترات (Waters *et al.*, 2005). كما أن هذه الأنواع لا تمتلك أنزيم اليورياز، أو أنزيم البيتاغلاكتوز، ولا تنتج الأندول (Parker *et al.*, 2002)، في حين أن لديها القدرة على نزع مجموعة الكربوكسيل، وهي غير محللة للجيلاتين، وتنتج ذيفاناً داخلياً يبقى محصوراً ضمن الخلايا وعند مهاجمة البكتيريا للأغشية الداخلية للأمعاء تسبب تهيج و تخريش في مخاطية الأمعاء و تكون مدة الحضانة أسبوعين تقريباً (Waters *et al.*, 2005).

2 - 5 تواجد الــ *Salmonella* في البيئة:

The existence of *Salmonella* in the environment

تنتشر الأنواع التابعة لجنس الــ *Salmonella* في أماكن مختلفة وعلى مدى واسع في البيئة، وتتواجد في أو على التربة، الأعلاف، الماء، والمستنقعات. بما أن فضلات الحيوانات المصابة بالــ *Salmonella* تحتوي على الــ *Salmonella*، فإن استخدام هذه الفضلات كسماد للمحاصيل يمكنها أن تنقل الإصابة لحيوانات أخرى. سقوط المطر على هذه المزارع الملوثة بالفضلات يمكن أن ينقل الأحياء إلى الجداول و البرك. إضافة إلى انتقال الأحياء من مآوي الحيوانات و المسالخ إلى مياه الصرف، يمكن لهذه المياه الملوثة أن تسبب الإصابة للحيوانات البرية التي تشرب منها. (Brown *et al.*, 1996)، ومن الممكن وجودها على المزروعات

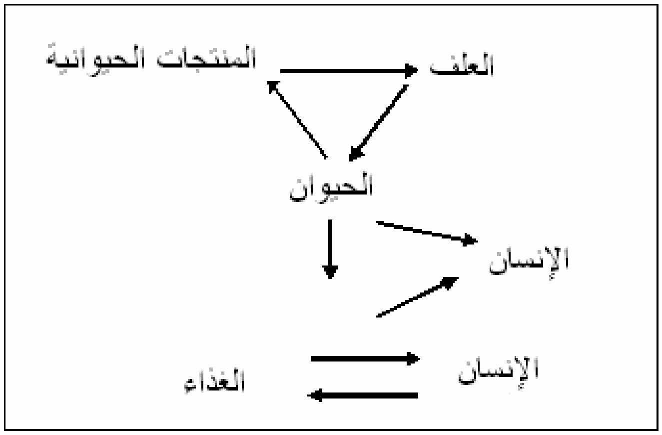
المروية في حال استخدام المياه الملوثة في عمليات الري، كما حدث في كندا عام 1985 (Alban *et al.*, 2002)، ومن أهم الأنواع التي تنتقل عبر ميـــاه الـــري *S. typhi* (Feachem *et al.*, 1983).

2 - 6 تواجد الـ *Salmonella* عند الحيوانات:

The existence of *Salmonella* in animals

تستطيع الأنواع التابعة لجنس *Salmonella* أن تسبب إصابة عدد كبير من الحيوانات المدجنة (الأليفة منها أو المزرعية) حيث أن هنالك سنوياً مليون ونصف حالة إصابة بين الكلاب المنزلية والخيول (Wright *et al.*, 2002)، كما تستطيع الحيوانات البرية والطيور المهاجرة نقل الإصابة من المناطق الموبوءة إلى المناطق النظيفة (Wright *et al.*, 2002)، ويعود السبب في ارتفاع معدل الإصابة إلى كون الموطن الأصلي للـــ *Salmonella* هي الجهاز الهضمي للحيوان وإلى إمكانية انتقالها من البراز إلى التربة والمياه، كما أنها تصل مع الدم إلى الجلد وشعر الحيوانات. كما يمكن لها الانتقال عبر فرشة الحظيرة من حيوان مصاب إلى آخر (Jay, 1996). وتلعب كل من القوارض والحشرات والعناكب دوراً في نقل الـــ *Salmonella* (Hui *et al.*, 1995).

تسبب الـــ *Salmonella* الالتهاب المعوي عند الدواجن وحدوث نسبة نفوق مرتفعة بـــين الطيور (المنلا، 1996)، وهي ليست فلورا طبيعية متواجدة في أمعاء الدواجن ولكنها مكتسبة مـــن البيئة المحيطة كالأعلاف وفرش الحظائر (Ng *et al.*, 2003). وفي أغلب الأحيان لا يظهر على الحيوانات الثديية البالغة المصابة أية أعراض خارجية تكتشف من قبل الطبيب البيطري، مما قـــد يسهل انتقالها عبر الأدوات البيطرية المستخدمة في الكشف البيطري إلى الحيوانات أو إلى الطبيب البيطري نفسه (Melba *et al.*, 2002). ويبين المخطط (1) دورة الإصابة بالـــــ Salmonella بين الإنسان والحيوان.



المخطط (1) مخطط دورة الإصابة بالـ *Salmonella* (Banwart, 1989)

2 - 7 تواجد الـ *Salmonella* في الأغذية:

The existence of *Salmonella* in food

تعتبر الـ *Salmonella* من البكتيريا المنتقلة عبر الغذاء (Mead *et al*., 1999) والمسببة للتسممات الغذائية (Robert Koch Institute, 2006)، وتعتبر اللحوم بشكل عام ولحوم الفروج بشكل خاص مصدر رئيسي لها (Alban *et al*., 2002)، كما يعتبر المسلخ من أكثر الأماكن التي تساهم في انتشار الـ *Salmonella* في اللحوم خاصة تلوثها بالغائط أثناء عملية النقل و التداول (Marg *et al*., 2001). تقضي عملية طبخ اللحوم الحمراء ولحوم الدواجن النيئة على الـ *Salmonella*، تعد الأغذية النيئة مصدراً لتلوث معدات الطعام وأدوات المطبخ كما أنه قد يحدث تلوث تصالبي بين الأغذية المطبوخة وتلك التي تؤكل نيئة، لذلك يجب مراقبة العمليات التي تجري على الطعام بعد الطبخ عن كثب لمنع حدوث التلوث بالـ *Salmonella* (Guthrie, 1992).

2-7-1 تواجد الـ *Salmonella* في الفروج:

The existence of *Salmonella* in chicken

بالاعتماد على الدراسات التي جرت في أواخر القرن العشرين في الولايات المتحدة الأمريكية، نجد أن نسبة لحوم الدواجن الملوثة بالـ *Salmonella* وصلت إلى أكثر من 64%، بالرغم من صعوبة تحديد نسبة تواجد الـ *Salmonella* في الدواجن بدقة، إلا أنه من الملاحظ

انخفاضها في السنوات الأخيرة نتيجة تطور الطرائق المستخدمة في مزارع ومسالخ الدواجن (Guthrie, 1992). وقد تتلوث الكتاكيت بشكل أولي من العش، مكان التربية، العلف الملوث، فضلات الحيوانات المصابة، أو من الحشرات. وتتواجد الـــ *Salmonella* على الجلد، الريش، وفضلات الذبح وتشجع ظروف المسالخ على انتشار هذه البكتيريا بين الذبائح مما يؤدي لارتفاع نسبة الدواجن المصابة وقد تصل لأكثر من 21% من الذبائح. وقد قدر مركز التحكم بالأمراض CDC نسبة حالات الإصابة بالـــ *Salmonella* عند البشر الناتجة عن الدواجن من 7,5 % وحتى 37 % (Wolffs *et al.*, 2007). جمعت 800 عينة في بورتوريكو من لحوم الدواجن على خط التصنيع في معمل لتعليب لحوم الدواجن فوجد أن 58% من الذبائح قبل استئصال الأحشاء كانت مصابة بالـــ *Salmonella*، و77% من الذبائح كانت موجبة لاختبار الـــ *Salmonella* بعد عمليات التقطيع الآلية (Guthrie, 1992).

أظهرت دراسة إحصائية عن تواجد مرض Salmonellosis في الولايات المتحدة الأمريكية جرت بين عامي 1983 و1997 أن حوالي 1.5 مليون حالة إصابة بشرية بالـــ *Salmonella*، 95% منها ناتجة عن تناول الأغذية الملوثة (Mead *et al.*, 1999)، أما في بريطانيا فقد كانت *S. enteritidis* و*S. typhimurium* مسؤولة عن 80% من الإصابات عند البشر نتيجة تناول لحوم الفروج (Humphrey, 2000). سببت دفعة من الفروج ملوثة بالـــ *Salmonella* في عام 2005 إصابة 2500 شخص ووفاة شخص بمرض Salmonellosis في اسبانيا (Lazcka *et al.*, 2006).

وجدت الكثير من الدراسات إمكانية تواجد الـــ *Salmonella* في المياه الناتجة عن غسيل الفروج بعد الذبح مباشرة وعلى سطح الفروج بعد الذبح مباشـــرة، حيـــث تـــراوح تعـــداد الـــــ *Salmonella* في مياه غسل الفروج 10^5 – 10^6 خلية/مل (Wolffs *et al.*, 2007). أمـــا فـــي فرنسا أُعلنت حالة الطوارئ في الأعوام الممتـــدة بـــين 1995 – 2002 نتيجـــة انتـــشار الـــــ *Salmonella* فـــي الميـــاه وبخاصـــة الأنـــواع *S. enterica* serovar *Typhimurium*، *S. enterica* serovar *Virchow, S.enterica* serovar *Infantis* إلا أن النوع الأكثر انتشاراً عن طريق الفروج في العالم هو النوع *S. typhimurium* (Touron *et al,*. 2005). ويعتبـــر النوع *S. pullorum* النوع المتواجد في الدواجن والذي يسبب الإسهال الأبيض العـــصوي لهـــا والنوع *S. gallinarum* المسبب لحمى التيفوئيد عند الدواجن الأنواع الأكثر ضـــرراً لـــصناعة الدواجن لأنها تسبب العديد من الوفيات بين قطعان الدواجن كما أن لها المقدرة على الانتقال عبـــر

لحوم الدواجن (الشايب، 2002)، وعلى الرغم من عدم تكوينها خطورة على صحة الإنسان، لكنها تسبب الإصابة بارتفاع درجة الحرارة في حال كان تعـدادها فـي الأغذيـة المتناولـة مرتفعـاً (Guthrie, 1992).

تقلل عمليات النقل والتجهيز بطريقة صحية من عدد البكتيريا على سطح الذبيحة، خلال عمليات التصنيع حيث تستطيع البكتيريا الملوثة للجلد الانتشار على السطح ثم في داخل الشقوق وكذلك الريش. فالغسيل في هذه المرحلة لا يزيل البكتيريا بل يساهم في انتشارها (Guthrie,1992).

2-7-2 تواجد الـ *Salmonella* في البيض وبعض منتجاته:
The existence of *Salmonella* in egg and some of its products

يمكن للأنواع التابعة لجنس الـ *Salmonella* أن تنتقل عبر الجهاز الهضمي للدواجن وتطرح عبر الزرق، إضافة لإمكانية انتقالها عبر الفرشات في الحظائر إلى البيض، كما يبدأ انتقال الـ *Salmonella* للبيض اعتباراً من المبيض (Jay, 1996). ويعتبر البيض المصدر الرئيسي للـ *S. enteritidis* (Bäumler *et al.*, 2000)، وقد بدأ انتشار *S. enteritidis* كوباء في منتصف الثمانينات (Ward *et al.*, 2000). وارتبط الكثير منها باستهلاك البيض (Crespo *et al.*, 2005). حيث يعتبر استهلاك البيض الخام من المخاطر الهامة على صحة الإنسان (Gillespie *et al.*, 2005)، ففي عام 1992 انتشرت حمى Salmonellosis في روسيا بين 364 حالة نتيجة تناول أغذية يدخل في تحضيرها البيض (Arnedo *et al.*, 1998)، وقد أكدت الدراسات الانتشار الواسع للأنواع *S. typhimurium* و*S. enteritidis* في قناة إنتاج البيض (Keller *et al.*, 1997)، وُجد في دراسة حول تواجد الـ *Salmonella* في الدواجن المنتجة للبيض في المزارع المنتشرة في أوروبا أن 20.3% من الدواجن مصاب بالـ *S. enteridis* (Malorny *et al.*, 2007). إضافة إلى ما سبق فإن *S. entertidis* قد تنتقل إلى البيض عبر العمال القائمين على جمع البيض من المزارع أو القائمين على عملية نقلها وتغليفها (Blumenthal, 1990).

وفي كثير من الحالات عدم وجود الـ *Salmonella* في منتجات البيض لا يعني عـدم وجود سمومها والتي تتواجد في البيض بكميات كبيرة (Rahman *et al.*, 1997).

وقد لاحظ العالم Bouldin وزملاؤه عام 2004 عدم تواجد الـ *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis* في البيض على الرغم من تواجدها في الفروج وقناة إنتاج البيض في الطير، إلا أن عدم تواجدها في البيض قد يعود إلى عدم توفر السكريات التي تحتاجها من جهة، إضافة إلى احتواء البيض نفسه على المضادات الحيوية الطبيعية كما أكدت دراسات (Sanchez *et al.*, 2007).

أجريت دراسة لـ 61 حالة إصابة بالـ *Salmonella* بين عامي 1963 و 1965، وجد أن المسبب في 23 حالة ناتجة عن تناول البيض ومنتجاته و 16 حالة من جراء تناول لحوم الدواجن والديك الرومي و 8 حالات من لحوم العجل والخنزير و 3 حالات من البوظة وحالتين من سلطة البطاطا و 9 حالات من أغذية أخرى (Jay, 1996).

تضمنت إحدى حالات الفوعة ظهور 965 حالة من بينها 404 حالات إصابة بالـ *Salmonella* وأدت إلى 9 حالات وفاة، وبعد التحري عن السبب فوجد أنه البيض النيء والإصابة ناتجة عن مبايض الدجاج المصاب في المزرعة المنتجة، أما المسبب المرضي فقد كان *S. entertidis*، إضافة للقدرة على الولوج من خلال الشقوق الصغيرة في قشرة البيضة. يتم إرجاع سبب التفشيات الناتجة عن *S. entertidis* في معظم الحالات إلى استهلاك البيض الملوث، ولكن ليس في جميعها، في إحدى الحالات في مطعم للوجبات السريعة وجد أن سبب ثلوث الطعام بالـ *Salmonella* هو الشخص الذي يقوم بتحضير الطعام والذي كان مصاب بالـ *Salmonella* (Guthrie, 1992).

2 - 8 - قدرة الـ *Salmonella* على مقاومة ظروف الوسط:

The ability of *Salmonella* to resist the environment conditions

تملك الـ *Salmonella* المقدرة على النجاة من الظروف المحيطة غير الطبيعية، حيث من الممكن لها التواجد في التربة وعلى العشب لأكثر من 200 يوم، ومن الممكن أن يتأثر هذا التواجد بالكثافة العشبية وضوء الشمس ودرجة الحرارة إضافة إلى معدل تساقط الأمطار في المنطقة (Hui *et al.*, 1995). كما يمكن للسالمونيلا النجاة في السماد السائل الذي يرش على العشب من 80 يوم (Burrows, 1985)، وحتى 33 أسبوع (Finlay, 1989)، ومن الممكن لها

التواجد على السواتر والأغلفة البلاستيكية المستخدمة في تغليف التربة لمـــدة 93 يـــوم (Bryan, 1980).

وقد أظهرت الدراسات أن للــ *Salmonella* المقدرة على التواجد في زرق الطيور لمـــا يزيد عن تسعة أيام، وعلى القشرة الخارجية للبيض لمدة قد تصل إلى 350 يـــوم، وفـــي البـــيض المجفف لأكثر من أربع سنوات (Jay, 1996). و من الممكن القضاء علـــى الـــــ *Salmonella* التي قد تتواجد على قشرة البيض أثناء إعداد البيض المجفف باتباع طريقة تستخدم فيهـــا درجـــة حرارة 60 ْم ولمدة زمنية طويلة (التجفيف البطيء) عوضاً عن استخدام التجفيف بـــالرذاذ حيـــث دلت الدراسات على أن للـــ *Salmonella* المعرضة للتجفيف المقدرة على استعادة نشاطها بعـــد مرور 41 أسبوع عند التخزين على الدرجة 20 ْم (Olsen *et al.*, 2000).

2 - 9- الأمراض التي تسببها الـــ *Salmonella*:

The disease caused by *Salmonella*

تُعتبر الإصابة بالـــ *Salmonella* عدوى مرضية وليس تسمم غذائي حيث أن هذه الأمراض تنتج من تناول غذاء يحتوي سلالات من جنس الـــ *Salmonella* بحيث تصل أعدادها لحد مناسب لإحداث إصابة. وتنخفض حالات الوفاة نتيجة العدوى بالـــ *Salmonella* ومعظم الحالات تكون بين الأطفال والمسنين أو المصابين بأمراض أخرى بحيث تصبح الإصابة بالـــ *Salmonella* حملاً إضافياً عليهم وهي تكثر عند المصابين بمتلازمة العوز المناعي المكتسب (الإيدز) (CDC, 2005). ويرجع تلوث الغذاء بهذه المكونات إلى وجود هذه المجموعة من البكتيريا في أمعاء العديد من الحيوانات الأليفة والبرية وما يتبعه من تلوثها للتربة ومصادر المياه والمجاري في المناطق المحيطة وبالتالي فرص وصولها إلى الغذاء وبصفة خاصة اللحوم والبيض والحليب ومنتجاته وبذلك تصبح الأغذية الملوثة من أهم مصادر العدوى للإنسان (Blaha, 2004).

تعد أنماط الـــ *Salmonella* التيفية ونظيرة التيفية مسؤولة عن انتشار الحمى التيفية ونظيرة التيفية لذلك تدعى الحمى المعوية حمى التيفوئيد والتي نادراً ما تنتج عن الطعام (إلا في حال تلوثه ببراز أو بول أشخاص مصابين) ولا تصنف عادة كإنسمام غذائي، تسبب أنواع الـــ *Salmonella* الأخرى في بعض الأحيان التهاب في المجاري البولية وانتان دم مما قد يؤدي إلى

التهاب السحايا والتهاب العظم ونقيه، تشاهد هذه الحالات بشكل أكثر شيوعاً عند المرضى المنهكين مناعياً وخصوصاً مرضى الإيدز، ويحمل الأشخاص المصابين بحمى التيفوئيد البكتيريا في مجرى الدم أو الطريق المعوي (Eley, 1993).

وتتلخص المظاهر السريرية للمرض بحسب (Eley, 1993):

1 - الأسبوع الأول: تبدأ الأعراض بعد فترة الحضانة بشكل أعراض عامة: صداع متدرج ــ آلام عضلية ومفصلية، وتعب وسعال وألم في البلعوم. مترافق بارتفاع حرارة يزداد بحوالي درجة واحدة يومياً حتى تصل إلى الــ 40 ْم في نهاية الأسبوع الأول وتستقر على هذه الدرجة و لا يستجيب في الأسبوع الثاني هذا الارتفاع في الحرارة لخافضات الحرارة وبعكس ما يحدث في باقي الحمَات فإن ارتفاع الحرارة لا يرافقه زيادة في ضربات القلب وهذا ما يميز الحمى التيفية عن باقي الأنواع . إضافة إلى آلام في البطن و انتفاخ و إمساك. تظهر في نهاية الأسبوع الأول اندفاعات جلدية خاصة على الجذع تدعى بطفح الحمى التيفية، وتكون هذه الاندفاعات بشكل بقع وردية قطرها حوالي /2 –3/ مم وتظهر على دفعات، فتدوم فترة 24 ساعة ثم تختفي لتظهر دفعة أخرى جديدة في اليوم الثاني.

2 – الأسبوع الثاني: يصبح البطن متمدداً ويتحول المريض إلى الإسهال بدلاً من الإمساك، وتبقى الحرارة مرتفعة في هذه المرحلة لذلك يبقى المريض بحالة ضعف عام ووهن. وإذا كانت مقاومة المريض ضعيفة يتطور هذا الإنهاك إلى مرحلة تسمى الحالة التيفية حيث يصبح المريض فيها كالمخبول وتسمى بالسبات اليقظ (عيناه مفتوحتان ــ خبل وتخليط ذهني، وأحياناً هياج) وتأتي خطورة هذه الحالة من كونها تزيد احتمال التعرض للاختلاجات أكثر من الحالة العادية ويكون الإسهال في هذه الحالة أكثر شدة حيث يصبح البراز سائلا بلون أصفر فاتح.

3– الأسبوع الثالث: وهي فترة الاختلاجات، إذا تركت الحمى التيفية بدون علاج فهي محددة لذاتها أي أن الشفاء يكون تلقائياً في أغلب الحالات إلا أن 30% من الحالات تتعرض للاختلاجات (في حال عدم العلاج)، لذلك عندما تتم المعالجة نمنع حدوث الاختلاجات، أما إذا لم تتم المعالجة فثلث الحالات معرضة لظهور الاختلاجات.

- المعالجة: يجب وضع المريض على حمية غنية بالحريرات، كما يجب إعطاؤه الصادات الحيوية المناسبة، ويعطى الكلورامفينيكول بمقدار 1.5 غ/ مرتين باليوم في الأيام الخمسة الأولى ثم يعطى 1 غ/ مرتين باليوم حتى تتمة الأسبوعين. والدواء المفضل حالياً السيبروفلوكساسين بمقدار 750 ملغ/ مرتين باليوم ولمدة ثلاث أسابيع، كما أن إعطاؤه لمدة شهر يزيل الحمى

ويقضي على البكتيريا في مكانها (مرارة، كلية...). يمكن معالجة المرضى بوضعهم على حمية غذائية غنية بالكربوهيدرات إضافة إلى إعطائهم الصادات الحيوية كالكلورامفينيكول أو السيبروفلوكساسين (Eley, 1993).

ترتكز الوقاية على معالجة مياه الصرف الصحي وكلورة مصادر المياه العامة، بسترة منتجات البيض، المراقبة الصحية لعمليات تصنيع الأغذية، منع حاملي حمى التيفوئيد من التعامل مع الأغذية، واستخدام برامج التحصين مما يقلل الإصابة بحمى التيفوئيد. لكن على الرغم من اتباع الوقاية ما زالت أمراض الـ *Salmonella* ترتفع بإطراد مما يدل على أن هذه الإجراءات غير فعالة لذلك يجب العمل على القضاء على هذه البكتيريا في كل أنواع الأغذية الخام، النيئة، المصنعة، المخزنة، و الموزعة تحت ظروف تمنع التلوث بالـ *Salmonella* (Banwart, 1989).

يعتبر أخذ اللقاحات فعالاً للحماية من الـ *Salmonella* حيث يوجد نوعين منها، أحدهما يُؤخذ عن طريق الفم (TY21A)، والآخر عن طريق الحقن في العضل (TAB) ويعتبر الأكثر فعالية (Blaha, 2004).

2 - 10 – طرق السيطرة على انتشار مرض الـ *Salmonella*:
Methods of control salmonellosis spread

بسبب مقدرة الـ *Salmonella* على الانتقال بين الانسان والحيوان أو بين الحيوانات المصابة منها والسليمة عبر التلامس المباشر أو الفضلات الحيوانية أو تحضير غذاء الانسان، فمن المجدي اتباع مجموعة من الاجراءات الوقائية للسيطرة على انتقال البكتيريا ومنع انتشار مرض Salmonellosis، والتي يجب أن تتوجه أساساً تجاه الحالة الصحية للحظائر عبر إزالة مخلفات الحيوانات وخاصة الروث من الحظائر بسرعة قدر المستطاع، إضافة إلى استئصال الحشرات والذباب، واستخدام الأعلاف الخالية من الـ *Salmonella* في تغذية الحيوانات، كما يجب الاهتمام بتنظيف مساكن الدواجن والحضانات والعمل على تطهيرها تطهيراً كافياً وبصورة دورية ومنتظمة، مع فحص الدجاج دورياً لاكتشاف أي إصابة والعمل على استئصال الاصابات فور حدوثها (حسين، 1997).

واتخاذ الاحتياطات الصحية الحازمة بالنسبة للمسالخ وفحص الحيوانـــات المعـــدّة للـــذبح، ومنع وصول التلوث للذبائح كما يجب الاهتمام بالفحوصـــات الجرثوميـــة للحيوانـــات المذبوحـــة اضطرارياً، وكذلك اتخاذ الإجراءات الصحية الصارمة لمحلات بيع اللحوم، وكـــذلك فـــي أثنـــاء تخزين اللحوم ومنتجاتها في الثلاجات وعند نقلها لمنع تلوثها بعد الذبح (Alocilia and Radke, 2003)، كما يجب العناية بتسخين الحليب (بالبسترة أو الغلي) والعناية بتوزيعه وبيعه نظيفاً خاليـــاً من البكتيريا المرضية، والاهتمام بطهي المواد الغذائية ذات المصدر الحيـــواني علـــى أن يكـــون الطهي كافٍ للقضاء على الـــ *Salmonella* (شحاته، 1999).

2 -11 - الطرق الحديثة في الكشف عن الـــ *Salmonella*:
The new methods of identification of *Salmonella*

يوجد العديد من طرائق الكشف عن البكتيريا المنتقلة عبر الغذاء والمسببة للأمراض عند الإنسان كالـــ *Salmonella* (Pitcher and Fry, 2000)، تتقاطع هذه الطرائق فيما بينها للسعي للحصول على نتائج سريعة إلا أنها تختلف فيما بينها في طريقة العزل والإغناء والتفريق (Stevens and Jaykus, 2004)، وعلى الرغم من استخدام الطرائق التقليدية في الكشف لفترة طويلة لدقتها العالية (Lazcka *et al.*, 2006)، إلا أنه كان لا بد من الحصول على طرائق أسرع في التحديد وذلك لخطورة الـــ *Salmonella* (Leonard *et al.*, 2003). يجري السعي بشكل دائم لاستنباط طرائق حديثة في تحديدها بأسرع وقت ممكن وبأكثر دقة ممكنة (Lazcka *et al.*, 2006). كتقنيتي الـــ API و الـــ PCR .

تتكون تقنية الـــ API 20E من شريط بلاستيكي عليه أنابيب دقيقة تحتوي ركائز مجفدة، توسعت هذه التقنية عام 1976 لتضم بكتيريا أخرى سالبة الغرام، و ذلك بإضافة خمس اختبارات منفصلة غير موجودة على الشريط البلاستيكي (Brooks *e t al*., 1974). قيم العديد من الباحثين هذه التقنية و لاحظوا وجود توافق كبير مع الاختبارات التقليدية (Nord *et al*., 1974).

تستخدم تقنية الـــ API 20E للكشف عن البكتيريا التابعة لعائلة *Enterobacteriaceae*، ومنها جنس الـــ *Salmonella*، حيث يتم بواسطتها الكشف عن ست أنواع تابعة لهذا الجنس وهي (*S. arizonae, S. choleraesuis, S. gallinarum, S.paratyphi A, S. pullorum, S. typhi,*) إضافة لكونه يُرمز لبقية الأنواع التي لا يمكن تحديدها بـــ *Salmonella* spp) (Smith *et al.*, 1972).

تعتبر تقنية التحليل البيوكيميائي (Leoni and Legnani, 2001) وتقنية التفاعل التسلسلي البوليمرازي PCR (Polymerase Chain Reaction) (Bej *et al.*, 1991)، من أهم التقنيات المستخدمة. وتعتمد تقنية التحليل البيوكيميائي على ردود أفعال سلالات الـ *Salmonella* المدروسة تجاه الاختبارات الحيوية الكيميائية (Nucera *et al.*, 2006)، وهي التقنية الأقدم في الكشف عن الـ *Salmonella* وتبقى الطريقة الأساسية والقياسية في التعريف على خصائص سلالات الـ *Salmonella* (Jones *et al.*, 2000). بداية يتم عزل السلالات على بيئات انتقائية للـ *Salmonella* وهي بيئات تحتوي على مواد مانعة لنمو الأحياء الدقيقة الأخرى، ويتم الاعتماد على لون المستعمرة وشكلها على الطبق ووجود هالات حولها أو ترسبات خاصة (Fratamico, 2003). ثم يتم اللجوء لدراسة نشاط هذه البكتيريا الكيميائي الحيوي، وعبر دراسة إنتاجها لبعض الأنزيمات أو الأحماض الأمينية وهذه التقنية تحتاج لدراية ومعرفة بكامل النشاطات التي تقوم بها السلالات التابعة لجنس الـ *Salmonella* (Lazcka *et al.*, 2006)، وهي بالتالي تحتاج لفترة طويلة في الكشف بين 4 – 9 أيام وحتى 16 يوم لإتمام الاختبارات التأكيدية (Brooks *et al.*, 2004). وهي بالتأكيد أمر لا يمكن الاعتماد عليه ولاسيما فيما يتعلق بالمخاطر الصحية و الغذائية (Lazcka *et al.*, 2006) من جهة، ومن جهة أخرى فإن هناك الكثير من السلالات المعزولة التي لها سلوك محدد ضمن الاختبارات الحيوية الكيميائية، إلا أن هذا السلوك في بعض الحالات لا يتوافق مع نوع محدد من الـ *Salmonella* (Woo *et al.*, 2000). لذلك تسعى الدراسات الحديثة لتدعيم الاختبارات الحيوية الكيميائية مع التقنيات الجزيئية لتحديد أنواع الـ *Salmonella* (Marino *et al.*, 2005)، لاستخدامهما معاً في الكشف عن الـ *Salmonella* (Lee *et al.*, 2003)، لا تحتاج تقنية الـ PCR سوى لبضع ساعات لانجازها (Lee *et al.*, 2003; Edwards *et al.*, 2001). وتعتمد هذه التقنية على تضخيم قطعة محددة من المادة الوراثية، وقد استخدمت في منتصف الثمانينات، وهي قابلة للتطبيق على أنواع عديدة من الـ *Salmonella*، وتحتاج لفترة قصيرة لا تزيد عن 24 ساعة إضافة إلى أنها لا تحتاج لعملية إغناء مسبقة (Lazcka *et al.*, 2006). وذلك باستخدام مرئسات (Primers) مختلفة (Touron *et al.*, 2005)، وقد جرى على هذه التقنية الكثير من التطوير للحصول على نتائج دقيقة بأقل فترة ممكنة. إلا أن سيئة تقنية الـ PCR عدم إمكانية استخدامها للكشف عن التعداد الحقيقي للبكتيريا الحية وذلك لأنها تعتمد على المادة الوراثية (Yaron and Mathews, 2002). وقد استخدمت تقنية الـ PCR في تحديد هوية الـ *Salmonella* المعزولة من عينات الفروج

في الولايات المتحدة الأمريكية (Fratamico, 2003)، تم الكشف عن الـــ *Salmonella* في مخلفات الدواجن المستخدمة كسماد بالاعتماد على مورثة invA (Jacobsen and Holben, 2007)، كما تم الاعتماد على نفس المورثة للكشف عن الـــ *Salmonella* في الفروج والبيض (Malorny *et al.*, 2007).

أوصت منظمة ISO باستخدام تقنيتي التحاليل الحيوية الكيميائية والـــ PCR في الكشف عن الـــ *Salmonella* في الأغذية (ISO, 2002)، حيث سمحت هاتان التقنيتان بالتعرف على *S. enterica* المعزولة من لحم الخنزير (Nucera *et al.*, 2006)، كما استخدمت للكشف عن تواجد الـــ *Salmonella* في مياه الغسيل الناتجة عن تنظيف الفروج وعلى سطح جلد الفروج (Wolffs *et al.*, 2007)، وكذلك للكشف عن تواجد الـــ *Salmonella* في مياه الشرب في فرنسا بين أعوام 1955 – 2002 (Touron *et al.*, 2005).

مواد وطرائق البحث
Materials and Methods

ثالثاً: مواد وطرائق البحث Materials and Methods

3 - 1 العينات: Samples

أُجري الكشف عن تواجد الـــ *Salmonella* في 335 عينة. 150 عينة فروج، و 105 عينات بيض و80 عينة كعك اسفنجي، والتي جُمعت من مناطق مختلفة من دمشق وريف دمشق، وبشكل عشوائي لمناطق سحب العينات، بحيث تم سحب العينات من المناطق (الزبلطاني، البرامكة، التجارة، التل، الدويلعة، الزاهرة، السبينة، الشعلان، الطبالة، القصاع، الكسوة، المرجة، المزة، المليحة، المهاجرين، الميدان، أبو رمانة، باب الجابية، باب السريجة، باب توما، باب مصلى، ببيلا، برزة، جرمانا، جوبر، حرستا، دمر البلد، دوما، سوق الهال، شارع بغداد، صحنايا، ضاحية الأسد، عسالي، قدسيا، كشكول، كفرسوسة، مزة جبل، مساكن برزة، ومشروع دمر)، وذلك ضمن الفترة الممتدة ما بين نيسان 2007 ونيسان 2008. ويمكن تلخيص طريقة جمع العينات للكشف عن تواجد الـــ *Salmonella* فيها بالخطوات التالية:

1- يفضل أخذ العينة بنفس الأدوات التي يستخدمها البائع.

2 – أُخذت العينات ضمن أكياس معقمة مسبقاً خاصة بأخذ العينات مزودة بشريط إغلاق ويلصق عليها بطاقة تعريف عليها رقم واسم العينة ومكان وتاريخ الجمع، وتنقل هذه الأكياس بطريقة مبردة إلى المخبر (2- 4ْ م).

3 – وُضعت الأكياس قبل عملية التحليل عند درجة حرارة الغرفة (20 – 25 ْم).

(USDA, 2004)

3 – 2 – البيئات: Media of culture

1 – مرق ببتون الموقي (Buffer peptone water) من شركة MERCK - ألمانيا.

جدول (2) مكونات بيئة (Buffer peptom water)

الكمية(g/litre)	المادة
10.0	ببتون من الكازئين Peptone from casein
5.0	كلور الصوديوم sodium chloride
9.0	فوسفات الهيدروجين ثنائي الصوديوم Disodium hydrogen phosphate dodecahydrate
1.5	فوسفات البوتاسيوم ثنائي الهيدروجين Potassium dihydrogen phosphate

تحضير الوسط: حل 25,5 غ من وسط مرق الببتون الموقي في ليتر ماء مقطر في عبوة مناسبة، حرك مع التسخين حتى تمام الذوبان، عقم بالصاد الموصدعلى درجة حرارة 121 ْم لمدة 15 دقيقة. pH: 7 ± 0,2 عند درجة حرارة 25 ْم.

2 – سلينيت السيستين ((Selenite Cystine Brot (SC) من شركة MERCK - ألمانيا.

جدول (3) مكونات بيئة (Selenite Cystine Brot)

الكمية (g/litre)	المادة
5.0	ببتون من الكازئين Peptone from casein
0.01	L(-)cystine
4.0	لاكتوز Lactose
10.0	الفوسفات الموقي phosphate buffer
4.0	سلينيت هيدروجين الصوديوم Sodium hydrogen selenite

تحضير الوسط: حل 23 غ من وسط سلينيت السيستين في ليتر ماء مقطر معقم، على درجة حرارة الغرفة، باستخدام عبوات مناسبة و أدوات معقمة. إن لزم الأمر سخن إلى درجة حرارة 60 ْم لتمام الذوبان (لا تعقم بالصاد الموصد). pH: 7 ± 0.2 عند درجة حرارة 25 ْم.

3 – بيئات صلبة انتقائية (*Salmonella Shigella* Agar (SS)) من شركة MERCK - ألمانيا.

جدول (4) مكونات بيئة (*Salmonella Shigella* Agar)

المادة	الكمية (g/litre)
Peptones ببتون	10.0
Lactose لاكتوز	10.0
Ox bile	8.5
sodium citrate سترات الصوديوم	10.0
sodium thiosulfate ثيوسلفات الصوديوم	8.5
Ammonium iron(III) citrate	1.0
brilliant green الأخضر اللماع	0.0003
Neutral red	0.025
agar-agar آغار	12.0

تحضير الوسط: حل 60 غ من وسط SS Agar في ليتر ماء مقطر معقم بشكل تام، باستخدام أدوات معقمة. (لا تعقم بالصاد الموصد).pH: 7 ± 0,2 عند درجة حرارة 25 ْم.

4 – بيئة البسموث سلفيد (Bismuth Sulphite Agar (BA)) من شركة MERCK - ألمانيا.

جدول (5) مكونات بيئة (Bismuth Sulphite Agar)

المادة	الكمية (g/litre)
Meat extract مستخلص اللحم	5.0
peptone from meat بيبتون من اللحم	10.0
D(+)glucose غلوكوز	5.0
فوسفات الهيدروجين ثنائي الصوديوم di-sodium hydrogen phosphate	4.0
iron(III) sulfate كبريتات الحديد	0.3
brilliant green الأخضر اللماع	0.025
bismuth sulfite indicator	8.0
Agar آغار	15.0

تحضير الوسط: حل 5.47 غ من وسط البسموث سلفيد في ليتر من الماء المقطر المعقم، حرك مع التسخين حتى تمام الذوبان (لا تعقم بالصاد الموصد). pH: 7.6 ± 0.2 عند درجة حرارة 25ْ م.

5 – هكتون آغار ((Hektoen Agar (HA) من شركة MERCK - ألمانيا.

جدول (6) مكونات بيئة (Hektoen Agar)

الكمية (g/litre)	المادة
15.0	Peptones ببتون
3.0	Yeast extract خلاصة الخميرة
5.0	Sodium chloride كلور الصوديوم
2.0	Bile salt mixture أملاح الصفراء
14.0	Sucrose سكروز
14.0	Lactose لاكتوز
2.0	Salicin
1.5	Anmonium iron (III) citrate
0.08	Acidic fuchsin حمض الفوكسين
5.0	Sodium thisulfate ثيوسلفات الصوديوم
0.05	Bromthymole blue أزرق البرموتمول
13.5	Agar آغار

تحضير الوسط: حل 75 غ من وسط الهيكتون آغار في ليتر ماء مقطر معقم، سخن بلطف مع التحريك حتى الغليان لبضع ثوان، حتى تمام الذوبان (لا تعقم بالصاد الموصد). pH: 7.7 ± 0.2 عند درجة حرارة 25ْ م.

6 - ثلاثي سكر الحديد ((Triple Sugar Iron Agar (TSI) من شركة MERCK - ألمانيا.

جدول(7) مكونات بيئة (Triple sugar iron agar)

الكمية (g/litre)	المادة
15.0	Peptone from casein ببتون من الكازئين
5.0	peptone from meat ببتون من اللحم
3.0	Yeast extract خلاصة الخميرة
3.0	Meat extract خلاصة اللحم
5.0	sodium chloride كلور الصوديوم
10.0	Lactose لاكتوز
10.0	Sucrose سكروز
1.0	D(+)glucose غلوكوز
0.5	ammonium iron(III) citrate سلفات الحديد
0.5	Sodium thiosulfate ثيو سلفات الصوديوم
0.024	Phenol red أحمر الفينول
12.0	Agar آغار

تحضير الوسط: حل 65 غ من وسط ثلاثي سكر الحديد في ليتر ماء مقطر مع التحريك و التسخين حتى تمام الذوبان، وزع في أنابيب اختبار، عقم بالصاد الموصد (على درجة حرارة 121 ْم لمدة 15 دقيقة). بعد التعقيم ضع الأنابيب بشكل مائل ونتركها حتى يتصلب الوسط. بحيث نحصل على قسم قائم وقسم مائل، pH: 7.4 ± 0.2 عند درجة حرارة 25 ْم.

7 – بيئة يوريا آغار (Urea Agar) من شركة MERCK - ألمانيا.

جدول (8) مكونات بيئة (Urea Agar)

الكمية (g/litre)	المادة
1.0	Peptone from meat ببتون
1.0	D(+)glucose غلوكوز
5.0	sodium chloride كلور الصوديوم
2.0	Potassium dihydrogen phosphate فوسفات البوتاسيوم ثنائي الهيدروجين
0.012	phenol red أحمر الفينيل
12.0	agar آغار
20.0	Urea يوريا

تحضير الوسط: حل 21 غ من الوسط و حرك مع التسخين حتى تمـام الـذوبان، عقـم بالـصاد الموصد (على درجة حرارة 121 ْم لمدة 15 دقيقة). أضف قبل الاستخدام 50 مل مـن محلـول اليوريا 40% المعقم، pH: 6.8 ± 0.2 عند درجة حرارة 25 ْم.

8 – بيئة سيمون سترات آغار (Simmons citrate medium agar (CIT)) من شركة MERCK - ألمانيا.

جدول (9) مكونات بيئة (Simmons citrate medium agar)

المادة	الكمية (g/litre)
فوسفات الأمونيوم ثنائي الهيدروجين Ammonium dihydrogen phosphate	1.0
فوسفات ثنائي البوتاسيوم di-potassium hydrogen phosphate	1.0
كلور الصوديوم sodium chloride	5.0
سترات الصوديوم sodium citrate	2.0
كبريتات المغنزيوم magnesium sulfate	0.2
أزرق البروموثيمول bromothymol blue	0.08
آغار Agar	13.0

تحضير الوسط: حل 22.3 غ من وسط سيمون سترات في ليتر ماء مقطر، حرك مـع التـسخين حتى تمام الذوبان، وزع الوسط في أنابيب اختبار، عقم بالصاد الموصد (علـى درجـة حـرارة 121 ْم لمدة 15 دقيقة). بعـد التعقيم ضع الأنابيب بشكل مائل ونتركها حتى يتـصلب الوسـط. pH: 6.6 ± 0.2 عند درجة حرارة 25 ْم.

9 – بيئة MR-VP Broth (Methyl-red Voges-proskauer Broth) من شركة MERCK - ألمانيا.

جدول (10) مكونات بيئة (Methyl-red Voges-proskauer Broth)

الكمية (g/litre)	**المادة**
7.0	بيتون من اللحم Peptone from meat
5.0	غلوكوز D(+)glucose
5.0	الفوسفات الموقي phosphate buffer

تحضير الوسط: حل 17 غ من وسط Mr-Vp في ليتر ماء مقطر، حرك مع التسخين حتى تمام الذوبان، وزع الوسط في أنابيب اختبار (5 ml لكل انبوب). عقم بالصاد الموصد (على درجة حرارة 121 ْم لمدة 15 دقيقة). pH: 6.9 ± 0.2 عند درجة حرارة 25 ْم.

3 – 3 - التحليل الميكروبيولوجي : Microbiological Analysis

3 – 3 - 1 - الكشف عن الــ *Salmonella* وعزلها:

Detecting and isolation of *Salmonella*

تمت عملية الكشف عن الــ *Salmonella* باتباع كل من طريقتي (June *et al.*, 1995) (NMKL, 1999) حسب ما يلي:

1 – وُضعت 25 غرام في أكياس معقمة محكمة الإغلاق مزودة بشريط، بالنسبة لعينات الكيك والكاتو والفروج بحيث تُمثل الكمية المذكورة كافة مناطق العينة، أما بالنسبة لعينات البيض كُسرت البيضة في بيشر معقم وتم خفقها بأداة معقمة ومن ثم تم صب 25 غ من مخفوق البيض في كيس معقم محكم الإغلاق مزود بشريط.

2 - أُكمل الحجم إلى 250 مل من وسط مرق البيتون (Buffer peptone water)، للحصول على تخفيف 1: 10. ومن ثم وُضع الكيس ضمن جهاز خاص لمزج العينات للحصول على معلق، بعدها نُقل المزيج إلى زجاجات معقمة ذات فوهة عريضة وغطاء محكم، وحضنت هذه الزجاجات عند الدرجة 37 ْم مدة 24 ساعة.

3 – نُقل 1 مل من مرق البيتون بواسطة ماصة معقمة إلى 10 مل من وسط سلينيت السيستين (SC) ثم حُضنت عند الدرجة 37 ْم مدة 24 ساعة.

4 - تمت الزراعة بطريقة التخطيط من المرق السابق على بيئات صلبة انتقائية (*Salmonella Shigella* Agar (SS)) و(Bismuth Agar [BA])، وهكتــون آغــار (Hektoen Agar) وحضنت الأطباق مدة 24 ساعة عند درجة حرارة 37 ْم، كما تمت زراعة حوالي 1 ســم^2 مــن قشرة البيضة بشكل مباشر على هذه الأوساط، وتعتبر النتيجة إيجابيــة إذا ظهــرت المــستعمرات شفافة مع أو بدون مركز أسود على بيئة SS، وبلون رمادي مع لمعة معدنية في بعض الأحيــان ومحاطة بهالة بنية في البداية تتحول إلى اسوداد مع ازدياد مدة التحضين وتنتج بعض الــسلالات مستعمرات خضراء اللون مع هالات أو بدونها على بيئة الــ BA وتعد مستعمرات نموذجية للـــ *Salmonella*، أما على بيئة الــ HA فتكون على شكل مستعمرات خضراء مزرقة مــع مركــز أسود وأحياناً بدون مركز أسود.

5 – كما تم الاستعانة بسلالة نقية من *Salmonella typhi* SO9 من مخابر مديريــة الــصحة لمقارنتها مع البكتيريا المعزولة.

3 – 3 - 2 - تحديد هوية وتوصيف الــ *Salmonella*:
Identification and characterization of *Salmonella*

تم تحديد هوية البكتيريا المعزولة، والتي يُعتقد أنها تتبع جنس الــ *Salmonella*، وذلــك بإجراء بعض الاختبارات البيوكميائية المحددة للأجناس والأنواع كــالفحص المجهــري وصــبغة الغرام واختبار الكاتلاز والاوكسيداز، إضافة لإجراء مجموعة من الاختبــارات الأخــرى يمكــن تلخيصها بما يلي:

1 - **دراسة تخمير بعض السكاكر**: زُرعت البكتيريا على بيئة ثلاثي سكر الحديد المائل (Triple Sugar Iron Agar [TSI])، التي تحتوي على سكريات الغلوكوز والسكروز واللاكتوز، حيــث تعطي الــ *Salmonella* على بيئة (TSI) لون أحمر على السطح المائل وأصــفر فــي القــسم العميق من البيئة، مع إعطاء اللون الأسود نتيجة تكوين غاز H_2S (Murray *et al.*, 1999).

2 – **اختبار اليوريا**: زُرعت المستعمرات التي تعتبر نموذجية للسالمونيلا ضمن أنابيــب تحتــوي على بيئة يوريا آغار (UREA Agar) ، وحضنت الأنابيب عند درجة 37 ْم مدة 24 ساعة وقــد اعتبر تحول اللون إلى اللون البنفسجي المحمر نتيجة إيجابية (Post, 1997).

3 – **اختبار الأندول**: كُشف عن مقدرة البكتيريا المعزولة على إنتاج الأنـدول باسـتخدام كاشـف كوفاك (kovacs reagent) إلى مرق تربتون Trypton broth بعد تنمية البكتيريا التي أعطـت مستعمرات نموذجية على البيئات الانتقائية، بعمر 24 ساعة، حيث يعتبر تكون حلقة حمراء مـن الاندوفينول Indophenol، دلالة على إيجابية الاختبار، أما عدم ظهور الحلقة وبقاء الوسط بلـون أصفر يدل على أن الاختبار سالب (AOAC, 2000).

4 – اختبار ONPG (O-Nitrophenyl – β-D- galactopyranoside): تُوضع المـستعمرة المشكوك بها في أنبوب يحتوي على 0.5 ml من ONPG وتُحضن عند درجة حرارة 37 ْم مدة 20 دقيقة وحتى 4 ساعات، يعتبر تغير اللون إلى الأصفر دلالة على إيجابية الاختبار (Funk *et al.*, 2000).

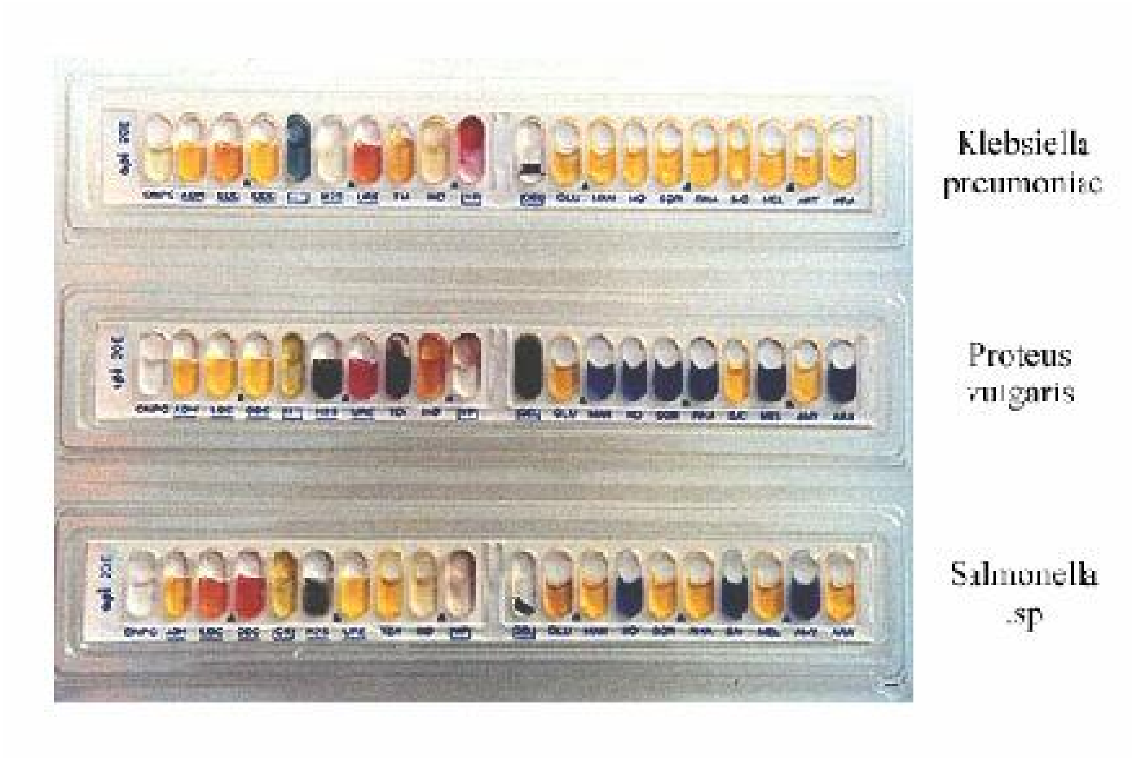
5- تفاعل فوجس بروسكار ((Voges proskawer (VP)): نميت البكتيريا المـراد دراسـة انتاجـها للأسيتوئين فـي 1 ml من مرق غلوكوز فوسفات (المكوَّن من 5 g غلوكوز، 5 g فوسفات ثنائي البوتاسيوم، 7 g ببتون ويكمل الحجم إلى لتر ماء مقطر) في درجة حرارة 37 ْم، وبعد مرور 20 ساعة، أضيف 0.5 ml من الكاشف الأول (محلول ألفانافتول α- Naphthol) (المحضر بإذابة 6 وحدات من ألفانافتول في 100 وحدة كحول اتيلي) و0.5 ml من الكاشف الثاني (KOH) (المحضر بإذابة 16 وحدة من KOH في 100 وحدة ماء مقطر)، يشير ظهور تلون بالأحمر بعد 5 دقائق بشكل عام إلى وجود الأسيتوئين وبالتالي تكون النتيجة إيجابية، في حين يدّل بقاء الوسط باللون الأصفر على نتيجة سلبية أي عدم إنتاج الأسيتوئين (Post, 1997).

6 – اختبار استخدام السترات كمصدر وحيد للكربون: اُستخدمت بيئة سيمون سترات آغار (Simmons citrate medium agar (SCA))، حيث زرعت البكتيريا المراد دراسة استهلاكها للسترات كمصدر وحيد للكربون ضمن أنابيب حاوية على بيئة SCA، وحضنت عند درجة 37 ْم مدة 48 ساعة. وبعد انتهاء فترة التحضين، اعتبر تحول لون الوسط من اللون الأخضر إلى اللون الأزرق نتيجة إيجابية للاختبار، أي أن البكتيريا المدروسة قادرة على استخدام السترات كمصدر وحيد للكربون، في حين اعتبرت النتيجة سلبية في حال بقاء الوسط باللون الأخضر (Iwade *et al.*, 2005).

7 – اختبار أحمر المثلين Methyl red test: أُضيفت 5 قطرات من كاشف المثيل الأحمر إلى 1 ml من مرق MRVP ورج الأنبوب إن ظهور اللون الوردي المائل للاحمرار دليل علـى أن الاختبار موجب أما اللون الأصفر فمعناه أن الاختبار سلبي (AOAC, 2000).

8 - تقنية API 20E (Analytical Profile Index) : اُستخدمت تقنية *API 20 E* للتمييز بين أنواع الـــ *Salmonella* المعزولة على البيئات الانتقائية، من شركة BioMérieux – فرنسا، والتي تتضمن مجموعة من الاختبارات الكيميائية الحيوية التي تسمح بدراسة استقلاب الكربوهيدرات المميزة لأنواع الـــ *Salmonella*، وذلك باستخدام الخطوات التالية (Jones *et al.*, 2000):

- تُحل المستعمرات البكتيرية في محلول ملحي 0.85%.
- تُملأ حفر قاعدة صفيحة الـــ API بالماء.
- يُوضع المحلول الملحي الحاوي على البكتيريا في صفيحة الـــ API، ثــم تُحــضن لمــدة 24 ساعة عند درجة حرارة 37 ْم.
- بعد انتهاء فترة التحضين، تُوضع الكواشف المناسبة وتُقرأ النتيجــة بمقارنــة الــصفيحة مــع الجداول المناسبة.



الصورة (1) تقنية الـــ API 20E

3 – 4 تقنية الدنـــا DNA technique

3-4-1 المرئسات المستخدمة Used primers

تم تصميم مرئسين primers (AS, S) والمبينة في الجدول 11 مع طوال الشدفة (fragment) التي تنتج عنها مقدرة بالشفع الأساسي ((Base Pairs (bp))، وباســتخدام البــرنامــج الخــاص بتصميــم المرئســات (NTI Vector) وذلك في مخبر الميكروبيولوجيا والمناعيات – هيئة الطاقة الذرية وبالاعتماد على المــورثة 16sRNA للكشــف عن الجنس (Lee *et al.*, 2003). وبالاســتعانة بتسلســل الدنا لكل من الســلالات:

الجدول (11) المرئسات المستخدمة وتسلسلها وطول الشدفة

المرئسة	التسلسل	السلالات	طول الشدفة bp
S	5'- CTGAAGACGCCGAAAGCATT-'3	*Salmonella spp.*	290
AS	5'-GTAGTCTCCCTCCTCAAGCG-'3		

3-4-2 تفاعل التضخيم المتسلسل PCR (Polymerase Chain Reaction):

جُمعت الـ *Salmonella* والتي بعمر 24 ساعة من أطباق SS أو BA ووُضعت في 100 µl ماء مقطر معقم منزوع الشوارد ضمن أنبوب ابندورف، وذلك من أجل الكشف عن الـ *Salmonella* باستخدام تقنية PCR بحسب (Jacobsen and Holben, 2007). ثم أُجريت عملية التثفيل بسرعة 14000 دورة/ دقيقة مدة 5 دقائق، أُضيف بعدها للراسب 200 µl من TRI و وُضع بعدها المزيج ضمن جهاز أمواج فوق صوتية مدة 15 ثانية، بعد ذلك أُضيف 400 µl من فينول كلوروفورم Phenol Chloroforme، ثُفل المزيج مدة 5 دقائق عند درجة حرارة المخبر بسرعة 14000 دورة/دقيقة. نُقل الطافي – بعد انتهاء التثفيل – إلى أنبوب ابندورف أخر، وأضيف له 40 µl Sodium acetate، ثم مزجت محتويات الأنبوب جيداً، واضيف له 1 ml من الإيتانول البارد 100%، وأعيد التثفيل بسرعة 14000 دورة/ دقيقة عند درجة 4 ْم، تم التخلص من الطافي و أضيف إتانول 70% واعيد التثفيل مدة 5 دقائق ليعاد التخلص من الطافي

ويترك الراسب ليجف، بعدها أضيف له 20 µl من TE، وحفظ الدنا (DNA) عند درجة حرارة 20 °م.

حضر مزيج بحجم 25 µl (Rahn *et al.*, 1992)، احتوى على 5 µl من معلق DNA، بالإضافة إلى 2.5 µl من المحلول الموقي (Reaction Buffer 10X)، 3 µl من كلوريد المغنيزيوم $MgCl_2$ (50 nM)، 0.5 µl من مـــزيج من الـــنكـــليوتيـــدات (DNTP) (بتـــركيز نهـــائي في التفاعل 1 p.mol / µl) من شركة Eurobio - فرنسا، 1 µl من المرئسات التي تناسب البكتيـــريا المدروسة. و1 µl مـــن أنزيـــم البوليمراز (DNA polymerase)، وأكمل الحجم باستخدام ماء مقطر.

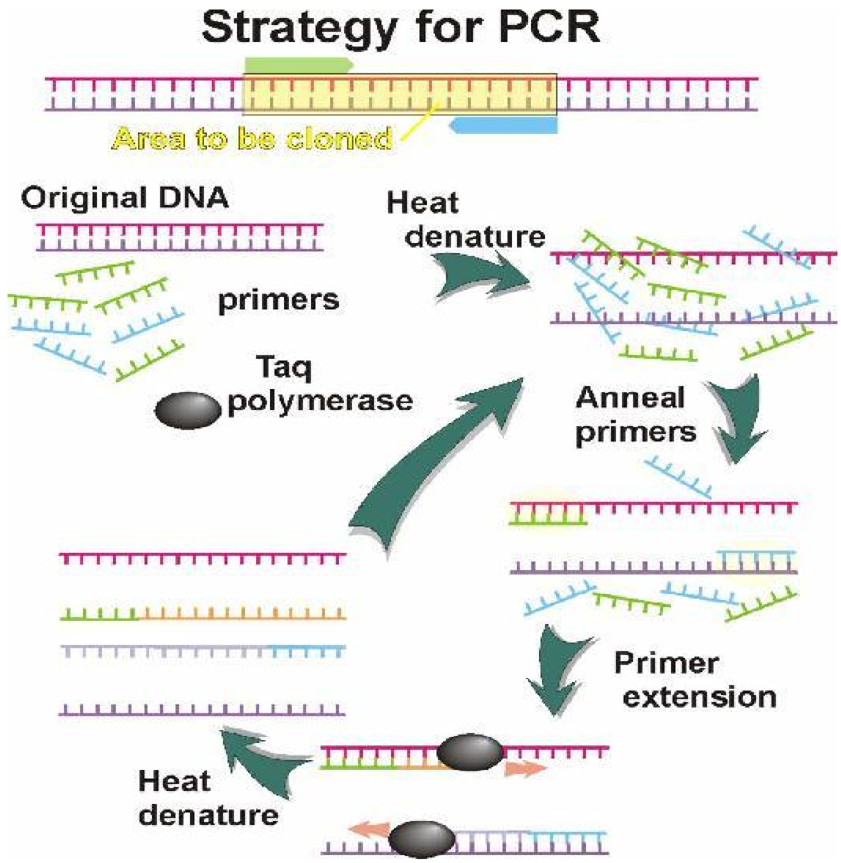
اعتمد برنامج التفاعل التسلسلي للبوليمراز PCR باستخدام جهاز PCR من شركة GENE Amp. - PCR system 9700 - أمريكا، وقد تكون البرنامج من 45 دورة، مُقسمة إلى عدة مراحل هي:

أ - مرحلة التمسخ (Denaturation) 94 °م مدة 30 ثانية

ب - مرحلة الالتحام (Annealing) 60 °م مدة 45 ثانية

ج - مرحلة الاستطالة (Extension) 72 °م مدة 30 ثانية

كما تضمن برنامج التحضين عند الدرجة 92 °م مدة 10 دقائق لدورة واحدة، وفي نهاية الدورات حضنت المحتويات عند الدرجة 72 °م مدة 10 دقائـــق كمرحلة استطالة نهائيـــة (Final extension)، وحُفظت نواتج التفاعل عند الدرجة 4 °م.



الصورة (2) مراحل تقنية الــ PCR

3-4-3 الرحلان الكهربائي Electrophoresis

رُحلـــت نواتـــج التفاعـــل على هـــلام آغاروز (Agarose gel) تركيزه 1.5% في محلول Tris – EDTA (TE) من شركة Eurobio - فرنسا، والمضاف له 3 µl من بروميد الاتيديوم (Ethidium bromide)، كما تمت الاســتعانة بعيــاريي الوزن الجزيئي للدنا (DNA Marker) من شركة Eurobio – فرنسا.

وقد استخدم جهاز الرحلان الكهربائي (electrophorese) من شركة BIO RAD- أمريكا، بجهد (فرق كمون) 85 فولط، وشدة تيار 150 أمبير مدة ساعة، وبعد انتهاء المدة درست الحزم المتشكلة وحللت الصور باستخدام جهاز ماسح الهلامة (gel Doc) من شركة UVITEC – أنكلترا.

3-4-4 التحليل الإحصائي: Statistical analysis

اُستخدم تصميم التجارب العشوائي البسيط، وأُجري التحليل الإحصائي للتجارب باستخدام البرنامج SPSS بطريقة Univariate.

بحيث تم إجراء التحليل الإحصائي لتحديد الفروق المعنوية والظاهرية على مستوى ثقة 95%، لكل من النسب المئوية لتواجد الـــ *Salmonella* في أجزاء الفروج، وفي المناطق التي تم سحب العينات منها، وبين الفصول الأربعة التي تم سحب العينات خلالها.

النتائج والمناقشة

Results and Discussion

رابعاً: النتائج والمناقشة Results and Discussion

4-1 نتائج الكشف عن الـــ *Salmonella* وعزلها
Results of detecting and isolation *Salmonella*

كُشف عن وجود الـــ *Salmonella* في 335 عينة منها 150 عينة فروج و105 عينات من البيض و80 عينة من الكعك الإسفنجي، جرى جمعها من مناطق مختلفة من دمشق وريفها، في الفترة الممتدة ما بين نيسان 2007 – نيسان 2008. يبين الجدول (12) نتائج الكشف عن الـــ *Salmonella* في الفروج ومنتجاته مرتبة حسب المناطق.

الجدول (12) الكشف عن الـــ *Salmonella* في الفروج ومنتجاته

رقم العينة	نوع العينة	مكان الجمع	تاريخ الجمع	تواجد الـــ *Salmonella*
1	فخذ	الزبلطاني	6 / 2007	+
2	صدر	الزبلطاني	2 / 2008	+
3	صدر	الزبلطاني	3 / 2008	-
4	فخذ	البرامكة	6 / 2007	_
5	قوانص	البرامكة	3 / 2008	_
6	فخذ	التل	6 / 2007	_
7	صدر	التل	7 / 2007	_
8	كبد	التل	10 / 2007	_
9	ظهر	التل	11 / 2007	+
10	رقبة	التل	11 / 2007	_
11	شاورما دجاج	الدويلعة	5 / 2007	_
12	فخذ	الدويلعة	6 / 2007	_
13	صدر	الدويلعة	7 / 2007	_
14	قلب	الدويلعة	9 / 2007	+
15	كبد	الدويلعة	9 / 2007	_
16	طحال	الدويلعة	11 / 2007	_

17	فخذ	الزاهرة	6 / 2007	_
18	ظهر	الزاهرة	8/ 2007	_
19	صدر	الزاهرة	2 / 2008	_
20	فخذ	السبينة	6 / 2007	_
21	صدر	السبينة	7 / 2007	_
22	قوانص	السبينة	3 / 2008	_
23	أحشاء	الطبالة	5 / 2007	+
24	فخذ	الطبالة	6 / 2007	_
25	ظهر	الطبالة	11 / 2007	_
26	صدر	الطبالة	2 / 2008	_
27	صدر	القصاع	8/ 2007	_
28	ظهر	القصاع	4 / 2008	_
29	فخذ	الكسوة	6 / 2007	_
30	جناح	الكسوة	6 / 2007	_
31	صدر	الكسوة	7 / 2007	_
32	رقبة	الكسوة	2 / 2008	_
33	قوانص	الكسوة	3 / 2008	_
34	جناح	المرجة	11 / 2007	_
35	صدر	المرجة	3 / 2008	_
36	فخذ	المزة	6 / 2007	+
37	جناح	المزة	6 / 2007	+
38	ظهر	المزة	8/ 2007	_
39	قلب	المزة	9 / 2007	_
40	كبد	المزة	9 / 2007	+
41	رقبة	المزة	11 / 2007	_
42	صدر	المزة	2 / 2008	_

43	قوانص	المزة	3 / 2008	_
44	فخذ	المليحة	6 / 2007	_
45	صدر	المليحة	8/ 2007	_
46	فخذ	المهاجرين	6 / 2007	_
47	صدر	المهاجرين	7 / 2007	_
48	قوانص	المهاجرين	12 / 2007	_
49	شاورما دجاج	الميدان	5 / 2007	_
50	فخذ	الميدان	6 / 2007	_
51	جناح	الميدان	6 / 2007	_
52	صدر	أبو رمانة	3 / 2008	_
53	ظهر	باب الجابية	8/ 2007	_
54	فخذ	باب الجابية	9 / 2007	_
55	قلب	باب الجابية	9 / 2007	_
56	قلب	باب الجابية	9 / 2007	+
57	كبد	باب الجابية	9 / 2007	+
58	فخذ	باب الجابية	10 / 2007	_
59	جناح	باب الجابية	1 / 2008	_
60	صدر	باب الجابية	2 / 2008	_
61	طحال	باب الجابية	7 / 2007	+
62	طحال	باب الجابية	7 / 2007	_
63	أحشاء	باب السريجة	5 / 2007	+
64	فخذ	باب السريجة	6 / 2007	_
65	جناح	باب السريجة	6 / 2007	_
66	أحشاء	باب السريجة	6 / 2007	_
67	فخذ	باب السريجة	7 / 2007	_
68	كبد	باب السريجة	9 / 2007	_

+	11 / 2007	باب السريجة	رقبة	69
_	11 / 2007	باب السريجة	قوانص	70
_	2 / 2008	باب السريجة	رقبة	71
+	7 / 2007	باب السريجة	طحال	72
_	7 / 2007	باب السريجة	طحال	73
_	4 / 2007	باب توما	شاورما دجاج	74
_	4 / 2007	باب توما	شاورما دجاج	75
_	6 / 2007	باب توما	فخذ	76
_	7 / 2007	باب توما	صدر	77
_	12 / 2007	باب توما	قوانص	78
_	5 / 2007	باب مصلى	أحشاء	79
_	8/ 2007	باب مصلى	فخذ	80
_	11 / 2007	باب مصلى	قوانص	81
+	11 / 2007	باب مصلى	أحشاء	82
+	7 / 2007	باب مصلى	طحال	83
_	7 / 2007	باب مصلى	طحال	84
_	6 / 2007	ببيلا	فخذ	85
_	6 / 2007	برزة	فخذ	86
_	10 / 2007	برزة	رقبة	87
+	10 / 2007	برزة	رقبة	88
_	11 / 2007	برزة	ظهر	89
_	3 / 2008	برزة	صدر	90
+	4 / 2007	برزة	شاورما دجاج	91
_	4 / 2007	جرمانا	شاورما دجاج	92
+	5 / 2007	جرمانا	أحشاء	93
_	5 / 2007	جرمانا	أحشاء	94

95	شاورما دجاج	جرمانا	5 / 2007	_
96	فخذ	جرمانا	6 / 2007	_
97	صدر	جرمانا	7 / 2007	_
98	قلب	جرمانا	9 / 2007	+
99	كبد	جرمانا	9 / 2007	_
100	أحشاء	جرمانا	10 / 2007	+
101	طحال	جرمانا	7 / 2007	_
102	فخذ	دمر البلد	6 / 2007	_
103	أحشاء	دمر البلد	11 / 2007	_
104	جناح	دمر البلد	1 / 2008	_
105	فخذ	دوما	6 / 2007	_
106	رقبة	دوما	2 / 2008	_
107	فخذ	سوق الهال	6 / 2007	_
108	فخذ	سوق الهال	6 / 2007	_
109	فخذ	سوق الهال	6 / 2007	+
110	جناح	سوق الهال	6 / 2007	_
111	رقبة	سوق الهال	8/ 2007	+
112	رقبة	سوق الهال	8/ 2007	_
113	قوانص	سوق الهال	3 / 2008	_
114	طحال	سوق الهال	7 / 2007	+
115	شاورما دجاج	شارع بغداد	4 / 2007	_
116	فخذ	صحنايا	6 / 2007	_
117	صدر	عسالي	7 / 2007	_
118	جناح	عسالي	1 / 2008	_
119	فخذ	قدسيا	6 / 2007	_
120	قلب	قدسيا	9 / 2007	_

121	كبد	قدسيا	9 / 2007	_
122	فخذ	كشكول	6 / 2007	_
123	صدر	كشكول	7 / 2007	_
124	قلب	كشكول	9 / 2007	+
125	كبد	كشكول	9 / 2007	+
126	طحال	كشكول	10 / 2007	+
127	شاورما دجاج	كفرسوسة	5 / 2007	_
128	فخذ	كفرسوسة	6 / 2007	_
129	جناح	كفرسوسة	12 / 2007	_
130	فخذ	مزة جبل	6 / 2007	_
131	أحشاء	مزة جبل	6 / 2007	+
132	صدر	مزة جبل	8/ 2007	_
133	قوانص	مزة جبل	11 / 2007	_
134	شاورما دجاج	مساكن برزة	5 / 2007	_
135	فخذ	مساكن برزة	6 / 2007	+
136	فخذ	مساكن برزة	6 / 2007	+
137	صدر	مساكن برزة	7 / 2007	_
138	صدر	مساكن برزة	8/ 2007	+
139	صدر	مساكن برزة	8/ 2007	_
140	ظهر	مساكن برزة	8/ 2007	+
141	قلب	مساكن برزة	9 / 2007	+
142	كبد	مساكن برزة	9 / 2007	+
143	ظهر	مساكن برزة	10 / 2007	_
144	قلب	مساكن برزة	10 / 2007	_
145	فخذ	مساكن برزة	11 / 2007	_
146	صدر	مساكن برزة	3 / 2008	+

147	ظهر	مساكن برزة	10 / 2007	+
148	فخذ	مشروع دمر	6 / 2007	_
149	قلب	مشروع دمر	10 / 2007	_
150	كبد	مشروع دمر	10 / 2007	_

يبين الجدول (13) دراسة إحصائية لنسب التلــوث بالـــــ *Salmonella* فـــي عينـــات الفـــروج والشاورما المأخوذة من محافظتي دمشق و ريف دمشق حسب نوع العينة المدروسة.

الجدول (13): عدد العينات الملوثة ونسبة التلوث بـــالـــ *Salmonella* حسب نوع العينة

نوع العينة	عدد العينات المدروسة	عدد العينات الملوثة	النسبة المئوية للتلوث %
أحشاء	10	6	60 a
طحال	10	5	50 a
قلب	10	5	50 a
كبد	10	4	40 ab
رقبة	10	3	30 abc
ظهر	10	3	30 abc
فخذ	35	5	14.2 bc
صدر	25	3	12 bc
جناح	10	1	10 bc
شاورما دجاج	10	1	10 bc
قوانص	10	0	0 c
المجموع	150	36	24

تشير الأحرف المتشابهه إلى عدم وجود فروق معنوية.

يُلاحظ من الجدولين (12) و(13) أن عدد العينات الملوثة بالـــــ *Salmonella* بلـــغ 36 عينة من مجموع العينات المدروسة والمقدرة بـــ 150 عينة، جُمعت مـــن أجـــزاء مختلفـــة مـــن

الفروج. وأنه لم يتم تسجيل أي نسبة إصابة بالـــ *Salmonella* في قوانص الفـــروج. ويُلاحـــظ أيضاً أن أعلى نسبة تواجد للبكتيريا كانت في أحشاء الفروج (60%)، وبفـــروق معنويـــة علـــى مستوى ثقة 95% مع الجناح والشاورما اللذان حققا أقل نـــسبة تلـــوث (10%). وذلـــك مخـــالف للدراسة المُجراه في المملكة العربية السعودية في الدمام والخبر في الفترة ما بين 1997 – 1999 على 605 عينة من الشاورما، ظهر منها 171 عينة لم توافق الشروط البكتريولوجية حيـــث تـــم عزل منها بكتيريا الـــ *Salmonella*، أي أن نسبة تواجد الـــ *Salmonella* 28.3%.(حـــسين، 2004). أيضاً يبين الجدول تواجد البكتيريا بنسبة عالية في القلب والطحال (50%)، بينما كانـــت النسبة أقل في الفخذ والصدر (14.2 و12% على التـــوالي). وهـــذا يخـــالف مـــا أورده العـــالم Sackey وزملاؤه عام 2001 في الدراسة التي أجراها على الفروج المباع في غانا حيث وجد أن أعلى نسبة تلوث كانت في منطقة الفخذ مـــن الفـــروج حيـــث بلغـــت 7.2% (Sackey *et al.*, 2001). بينما كانت أعلى نسبة للتلوث بالـــ *Salmonella* في الدراسة التي أُجريت على العينات المأخوذة من منطقتي دمشق و ريفها في منطقة الأحشاء، أما في منطقـــة الفخـــذ فكانـــت النـــسبة 14.2%.

يبين الجدول (14) دراسة إحصائية لنسب التلوث بالـــ *Salmonella* للعينات المدروسة حسب مناطق جمع العينات.

جدول(14) عدد العينات الملوثة ونسبة التلوث بـــالـــ *Salmonella* حسب المناطق

مكان أخذ العينة	عدد العينات المدروسة	عدد العينات الملوثة	النسبة المئوية للتلوث %
الزبلطاني	3	2	66.66
كشكول	5	3	60
مساكن برزة	14	8	57.14
المزة	8	3	37.5
سوق الهال	8	3	37.5
باب مصلى	6	2	33.3
برزة	6	2	33.3
جرمانا	10	3	30
باب الجابية	10	3	30
باب السريجة	11	3	27.27
الطبالة	4	1	25

مزة جبل	4	1	25
التل	5	1	20
الدويلعة	6	1	16.6
المجموع	100	36	36

يُلاحظ ارتفاع نسبة تواجد الــ *Salmonella* في منطقة الزبلطاني (66,6%)، و بدون فروق معنوية مع منطقة الدويلعة التي حققت أقل نسبة تلوث (16.6%). كما تراوحت نسبة التواجد بين هاتين النسبتين في كل من المناطق (كشكول، مساكن برزة، المزة، سوق الهال، باب مصلى، برزة، جرمانا، باب الجابية، باب السريجة، الطبالة، مزة جبل، التل). في حين خلت العينات من الــ *Salmonella* في كل من المناطق (البرامكة، الزاهرة، السبينة، القصاع، الكسوة، المرجة، المليحة، الميدان، أبو رمانة، باب توما، ببيلا، دوما، صحنايا، عسالي، قدسيا، كفرسوسة، شارع بغداد، دمر البلد، مشروع دمر، المهاجرين). لم تظهر فروق واضحة بين دمشق وريفها من حيث تواجد الــ *Salmonella* في الفروج.

يبين الجدول (15) دراسة إحصائية لنسب التلوث بالــ *Salmonella* للعينات المدروسة حسب توزعها في فصول السنة.

جدول (15) نسب تواجد الــ *Salmonella* حسب فصول السنة.

الفصل	عدد العينات المدروسة	عدد العينات الملوثة	النسبة المئوية للتلوث %
ربيع	52	11	21.15 ab
صيف	48	16	33.33 a
خريف	28	7	25 ab
شتاء	22	2	9.09 b
المجموع	150	36	24

تشير الأحرف المتشابهه إلى عدم وجود فروق معنوية.

يلاحظ من الجدول (15) أن أعلى نسبة تلوث بالــ *Salmonella* ظهــرت فــي فــصل الصيف (33.33%) بفروق معنوية مع النسبة المئوية المسجلة في فصل الشتاء (9.09%). وهــذا

يتوافق مع ما أورده الشايب بارتفاع نسبة الإصابة بالــ *Salmonella* صيفاً (الــشايب، 2002)، بينما تقاربت النسب المئوية للتلوث في فصلي الخريف والربيع (21.15 و25% على التوالي).

يبين الجدول (16) نتائج الكشف عن تواجد الــ *Salmonella* في 105 عينات من البيض جمعت من مناطق مختلفة من دمشق وريفها، مرتبة حسب مناطق جمع العينات.

الجدول (16) الكشف عن الــ *Salmonella* في البيض

رقم العينة	نوع العينة	مكان الجمع	تاريخ الجمع	تواجد الــ *Salmonella*
1	بيض	البرامكة	8/ 2007	_
2	بيض	التجارة	12 / 2007	_
3	بيض	التل	5 / 2007	_
4	بيض	الزاهرة	5 / 2007	_
5	بيض	الزبلطاني	8/ 2007	_
6	بيض	الطبالة	7 / 2007	_
7	بيض	القصاع	12 / 2007	_
8	بيض	القصاع	4 / 2008	_
9	بيض	القصاع	4 / 2008	_
10	بيض	القصاع	4 / 2008	_
11	بيض	القصاع	4 / 2008	_
12	بيض	الكسوة	5 / 2007	_
13	بيض	الكسوة	2 / 2008	_
14	بيض	الكسوة	2 / 2008	_
15	بيض	المرجة	3 / 2008	_
16	بيض	المرجة	3 / 2008	_
17	بيض	المرجة	3 / 2008	_
18	بيض	المرجة	3 / 2008	_
19	بيض	المزة	9 / 2007	_
20	بيض	المزة	9 / 2007	_
21	بيض	المزة	9 / 2007	_
22	بيض	المزة	12 / 2007	_

_	5 / 2007	المليحة	بيض	23
_	5 / 2007	المهاجرين	بيض	24
_	4 / 2007	باب الجابية	بيض	25
_	4 / 2007	باب الجابية	بيض	26
_	4 / 2007	باب الجابية	بيض	27
_	7 / 2007	باب الجابية	بيض	28
_	4 / 2007	باب السريجة	بيض	29
_	4 / 2007	باب السريجة	بيض	30
_	4 / 2007	باب السريجة	بيض	31
_	7 / 2007	باب السريجة	بيض	32
_	6 / 2007	باب توما	بيض	33
_	6 / 2007	باب توما	بيض	34
_	7 / 2007	باب توما	بيض	35
_	8/ 2007	باب مصلى	بيض	36
_	8/ 2007	باب مصلى	بيض	37
_	8/ 2007	باب مصلى	بيض	38
_	12 / 2007	باب مصلى	بيض	39
_	1 / 2008	باب مصلى	بيض	40
_	8/ 2007	البرامكة	بيض	41
_	8/ 2007	البرامكة	بيض	42
_	8/ 2007	البرامكة	بيض	43
_	8/ 2007	البرامكة	بيض	44
_	12 / 2007	البرامكة	بيض	45
_	1 / 2008	البرامكة	بيض	46
_	1 / 2008	البرامكة	بيض	47
_	11 / 2007	برزة	بيض	48
_	11 / 2007	برزة	بيض	49
_	11 / 2007	برزة	بيض	50
_	12 / 2007	برزة	بيض	51
_	6 / 2007	جرمانا	بيض	52
_	6 / 2007	جرمانا	بيض	53

54	بيض	جرمانا	6 / 2007	_
55	بيض	جرمانا	7 / 2007	_
56	بيض	دمر البلد	8/ 2007	_
57	بيض	دمر البلد	10 / 2007	_
58	بيض	دمر البلد	10 / 2007	_
59	بيض	دمر البلد	10 / 2007	_
60	بيض	دوما	5 / 2007	_
61	بيض	الدويلعة	6 / 2007	_
62	بيض	الدويلعة	7 / 2007	_
63	بيض	الدويلعة	8/ 2007	_
64	بيض	سوق الهال	8/ 2007	_
65	بيض	سوق الهال	8/ 2007	_
66	بيض	سوق الهال	8/ 2007	_
67	بيض	سوق الهال	1 / 2008	_
68	بيض	سوق الهال	1 / 2008	_
69	بيض	سوق الهال	1 / 2008	_
70	بيض	سوق الهال	1 / 2008	_
71	بيض	سوق الهال	1 / 2008	_
72	بيض	سوق الهال	1 / 2008	_
73	بيض	الطبالة	8/ 2007	_
74	بيض	الطبالة	8/ 2007	_
75	بيض	الطبالة	8/ 2007	_
76	بيض	قدسيا	5 / 2007	_
77	بيض	قدسيا	2 / 2008	_
78	بيض	قدسيا	2 / 2008	_
79	بيض	قدسيا	2 / 2008	_
80	بيض	كشكول	8/ 2007	_
81	بيض	كشكول	8/ 2007	_
82	بيض	كشكول	8/ 2007	_
83	بيض	كشكول	12 / 2007	_
84	بيض	كفرسوسة	8/ 2007	_

85	بيض	كفرسوسة	8/ 2007	_
86	بيض	كفرسوسة	12 / 2007	_
87	بيض	كفرسوسة	1 / 2008	_
88	بيض	كفرسوسة	1 / 2008	_
89	بيض	مزة جبل	9 / 2007	_
90	بيض	مزة جبل	9 / 2007	_
91	بيض	مزة جبل	9 / 2007	_
92	بيض	مزة جبل	9 / 2007	_
93	بيض	مساكن برزة	7 / 2007	_
94	بيض	مساكن برزة	11 / 2007	_
95	بيض	مساكن برزة	11 / 2007	_
96	بيض	مساكن برزة	11 / 2007	_
97	بيض	مساكن برزة	11 / 2007	_
98	بيض	مشروع دمر	10 / 2007	_
99	بيض	مشروع دمر	10 / 2007	_
100	بيض	مشروع دمر	10 / 2007	_
101	بيض	مشروع دمر	12 / 2007	_
102	بيض	مهاجرين	3 / 2008	_
103	بيض	مهاجرين	3 / 2008	_
104	بيض	مهاجرين	3 / 2008	_
105	بيض	مهاجرين	3 / 2008	_

يُلاحظ من الجدول (16) خلو جميع العينات من الـ *Salmonella* لدى التحري عنها في 105 عينات من البيض، وذلك على الرغم من إمكانيـة انتقـال الأنـواع التابعـة لجـنس الـ *Salmonella* إلى البيض عبر الجهاز الهضمي للدواجن أو المبـيض (Jay, 1996). وبـالرغم من تسجيل حالات تسمم ناتجة عن الـ *Salmonella* من التغذية على البـيض (Bäumler *et al.*, 2000; Ward *et al.*, 2000؛ Malorny *et al.*, 2007). لكن ربما يعود ذلك لإجـراءات الوقاية والتلقيح المتبعة و عمليات تعقيم المداجن و التخلص من الدجاج المصاب.

يبين الجدول (17) نتائج الكشف عن تواجد الـــ *Salmonella* في الكعك الإسفنجي والمرتبة حسب المناطق.

الجدول (17) نتائج الكشف عن تواجد الـــ *Salmonella* في الكعك الإسفنجي

رقم العينة	نوع العينة	مكان الجمع	تاريخ الجمع	تواجد الـــ *Salmonella*
1	كعك اسفنجي	البرامكة	8/ 2007	_
2	كعك اسفنجي	البرامكة	8/ 2007	_
3	كعك اسفنجي	البرامكة	8/ 2007	_
4	كعك اسفنجي	البرامكة	11 / 2007	_
5	كعك اسفنجي	البرامكة	1 / 2008	_
6	كعك اسفنجي	البرامكة	1 / 2008	_
7	كعك اسفنجي	التجارة	12 / 2007	_
8	كعك اسفنجي	التل	6 / 2007	_
9	كعك اسفنجي	الدويلعة	6 / 2007	_
10	كعك اسفنجي	الزاهرة	4 / 2007	_
11	كعك اسفنجي	الزاهرة	5 / 2007	_
12	كعك اسفنجي	الزبلطاني	8/ 2007	_
13	كعك اسفنجي	الشعلان	4 / 2007	_
14	كعك اسفنجي	الطبالة	7 / 2007	_
15	كعك اسفنجي	الطبالة	8/ 2007	_
16	كعك اسفنجي	الطبالة	8/ 2007	_
17	كعك اسفنجي	القصاع	12 / 2007	_
18	كعك اسفنجي	القصاع	3 / 2008	_
19	كعك اسفنجي	القصاع	3 / 2008	_
20	كعك اسفنجي	القصاع	4 / 2008	_
21	كعك اسفنجي	الكسوة	2 / 2008	_
22	كعك اسفنجي	الكسوة	2 / 2008	_
23	كعك اسفنجي	المرجة	3 / 2008	_
24	كعك اسفنجي	المرجة	4 / 2008	_
25	كعك اسفنجي	المزة	9 / 2007	_
26	كعك اسفنجي	المزة	9 / 2007	_

27	كعك اسفنجي	المزة	11 / 2007	_
28	كعك اسفنجي	المليحة	5 / 2007	_
29	كعك اسفنجي	المليحة	3 / 2008	_
30	كعك اسفنجي	المهاجرين	5 / 2007	_
31	كعك اسفنجي	المهاجرين	3 / 2008	_
32	كعك اسفنجي	المهاجرين	3 / 2008	_
33	كعك اسفنجي	المهاجرين	4 / 2008	_
34	كعك اسفنجي	باب الجابية	7 / 2007	_
35	كعك اسفنجي	باب توما	6 / 2007	_
36	كعك اسفنجي	باب توما	7 / 2007	_
37	كعك اسفنجي	باب توما	4 / 2008	_
38	كعك اسفنجي	باب مصلى	8/ 2007	_
39	كعك اسفنجي	باب مصلى	8/ 2007	_
40	كعك اسفنجي	باب مصلى	8/ 2007	_
41	كعك اسفنجي	باب مصلى	1 / 2008	_
42	كعك اسفنجي	باب مصلى	1 / 2008	_
43	كعك اسفنجي	البرامكة	12 / 2007	_
44	كعك اسفنجي	برزة	11 / 2007	_
45	كعك اسفنجي	برزة	12 / 2007	_
46	كعك اسفنجي	برزة	12 / 2007	_
47	كعك اسفنجي	جرمانا	5 / 2007	_
48	كعك اسفنجي	جرمانا	7 / 2007	_
49	كعك اسفنجي	جرمانا	7 / 2007	_
50	كعك اسفنجي	جوبر	7 / 2007	_
51	كعك اسفنجي	حرستا	4 / 2007	_
52	كعك اسفنجي	دمر البلد	8 / 2007	_
53	كعك اسفنجي	دمر البلد	10 / 2007	_
54	كعك اسفنجي	دمر البلد	10 / 2007	_
55	كعك اسفنجي	دمر البلد	10 / 2007	_
56	كعك اسفنجي	دوما	5 / 2007	_
57	كعك اسفنجي	الدويلعة	6 / 2007	_

58	كعك اسفنجي	الدويلعة	8 / 2007	_
59	كعك اسفنجي	الدويلعة	2 / 2008	_
60	كعك اسفنجي	ضاحية الأسد	4 / 2007	_
61	كعك اسفنجي	قدسيا	5 / 2007	_
62	كعك اسفنجي	قدسيا	2 / 2008	_
63	كعك اسفنجي	قدسيا	2 / 2008	_
64	كعك اسفنجي	كشكول	8 / 2007	_
65	كعك اسفنجي	كشكول	12 / 2007	_
66	كعك اسفنجي	كفرسوسة	8 / 2007	_
67	كعك اسفنجي	كفرسوسة	12 / 2007	_
68	كعك اسفنجي	كفرسوسة	12 / 2007	_
69	كعك اسفنجي	مزة جبل	9 / 2007	_
70	كعك اسفنجي	مزة جبل	9 / 2007	_
71	كعك اسفنجي	مزة جبل	10 / 2007	_
72	كعك اسفنجي	مزة جبل	10 / 2007	_
73	كعك اسفنجي	مساكن برزة	7 / 2007	_
74	كعك اسفنجي	مساكن برزة	11 / 2007	_
75	كعك اسفنجي	مساكن برزة	11 / 2007	_
76	كعك اسفنجي	مشروع دمر	9 / 2007	_
77	كعك اسفنجي	مشروع دمر	9 / 2007	_
78	كعك اسفنجي	مشروع دمر	10 / 2007	_
79	كعك اسفنجي	مشروع دمر	11 / 2007	_
80	كعك اسفنجي	مشروع دمر	12 / 2007	_

نجد من الجدول (17) عدم وجود بكتيريا تابعة للجنس *Salmonella* في الكعك الإسفنجي، ربما يعود ذلك لتعرض جميع منتجات الكعك الاسفنجي أثناء تحضيرها إلى درجات حرارة مرتفعة كافية للقضاء على الـــ *Salmonella* في حال تواجدها.

وهذا يخالف ما أكدته أبحاث وزارة الصحة الأمريكية التي جرت في مطلع القرن انتشار حالات الحمى الناتجة عن الـــ *Salmonella* (Salmonellosis) نتيجة تناول الكعك الإسفنجي المصنع من البيض الطازج المصاب أو المكسور والمخزن في أماكن ذات درجات حرارة مرتفعة

وفي أماكن غير نظيفة، فقد تواجدت الـــ *Salmonella* في 17 عينة كعك الإسفنجي مخبوزة تجارياً من أصل 247 عينة مدروسة. وبالتالي كان هذا مناقض لما تم تداوله عبر تلوث الكعك من الحليب المكثف المضاف والذي تم بالتالي منع إضافته للكعك الإسفنجي في الولايات المتحدة الأمريكية (DHS, 2000).

يبين الجدول (18) دراسة إحصائية لنسب توزع الـــ *Salmonella* في كل من عينات الفروج والشاورما والبيض والكعك الإسفنجي.

جدول (18) نسب تواجد الـــ *Salmonella* في كل من الفروج والبيض ومنتجاتهما

نوع العينة	عدد العينات المدروسة	عدد العينات الملوثة	النسبة المئوية للتلوث %
تواجد في الفروج	140	35	25 a
شاورما	10	1	10 ab
تواجد في البيض	105	0	0 b
تواجد في الكعك الإسفنجي	80	0	0 b
المجموع	335	36	10.7

تشير الأحرف المتشابهه إلى عدم وجود فروق معنوية.

يلاحظ وجود فرق معنوي بين نسبة تواجد الـــ *Salmonella* في الفروج مع نسبة تواجدها في البيض والكعك الإسفنجي.

يبين الجدول (19) نسبة تلوث مناطق سحب العينات المدروسة (بيض وفروج ومنتجاتهما) بالـــ *Salmonella*.

جدول (19) نسب المناطق الملوثة بالـــ *Salmonella*

مكان أخذ العينة	عدد المناطق المدروسة	عدد المناطق المدروسة في مدينة دمشق	عدد المناطق المدروسة في ريف دمشق	عدد المناطق الملوثة	عدد المناطق الملوثة في مدينة دمشق	عدد المناطق الملوثة في ريف دمشق	النسبة المئوية للتلوث %
المناطق التي تم السحب منها (فروج والشاورما)	34	23	11	14	12	2	41.17
المناطق التي تم السحب منها كافة العينات	39	25	14	14	12	2	35.89

لوحظ أن 41% من المناطق المدروسة من مدينة دمشق وريفها وُجد فيها عينات فروج ملوثة بالـــ *Salmonella*. أما النسبة المئوية للتلوث في المناطق التي تم سحب منها عينات فروج وبيض ومنتجاتهما فقد كانت 36%.

2-4 نتائج تحديد الـــ *Salmonella*:

The results of identification of *Salmonella*

تم عزل 36 سلالة أعطت مستعمرات نموذجية على البيئات الانتقائية، وظهرت تحت المجهر عصوية سالبة الغرام، وجميع العزلات موجبة الكاتالاز، سالبة الأوكسيداز. جرى على العزلات مجموعة من الاختبارات من أجل تحديد هوية العزلات. حيث تمت دراسة مقدرة السلالات على تخمير سكر الغلوكوز والسكروز واللاكتوز على بيئة (TSI)، اختبار اليوريا على بيئة يوريا أغار (URE)، اختبار الأندول (IND) على مرق التربتون، اختبار (ONPG)، تفاعل فوجس بروسكار (VP)، اختبار استخدام السترات كمصدر وحيد للكربون (CIT) إضافة لاختبار أحمر المثلين (MR)، ويوضح الجدول (20) هذه الاختبارات.

جدول (20) نتائج الاختبارات التي تم إجراؤها على عزلات الـــ *Salmonella*

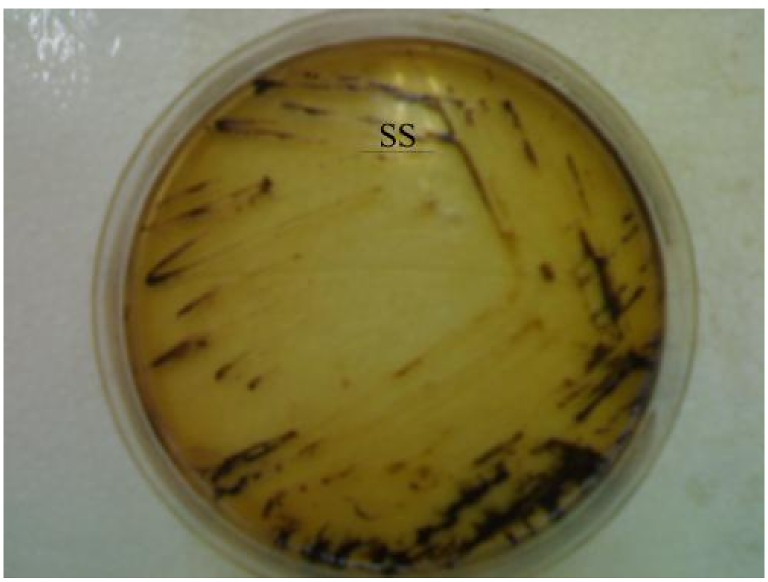
ONPG	URE	CIT	Vp	Mr	IND	TSI	HA	BA	SS	رقم السلالة
_	_	+	_	+	_	+	+	+	+	1
+	_	+	_	+	+	+	+	+	+	2
_	_	+	_	+	_	+	+	+	+	3
_	_	+	_	+	_	+	+	+	+	4
_	_	+	_	+	_	+	+	+	+	5
_	_	+	_	+	_	+	+	+	+	6
_	_	+	_	+	_	+	+	+	+	7
_	_	+	_	+	_	+	+	+	+	8
+	_	+	_	+	_	+	+	+	+	9
_	_	+	_	+	_	+	+	+	+	10
_	_	+	_	+	_	+	+	+	+	11
_	_	+	_	+	_	+	+	+	+	12
+	_	+	_	+	_	+	+	+	+	13
_	_	+	_	+	_	+	+	+	+	14
+	_	+	_	+	_	+	+	+	+	15
+	_	+	_	+	_	+	+	+	+	16
_	_	+	_	+	_	+	+	+	+	17
_	_	+	_	+	_	+	+	+	+	18
_	_	+	_	+	_	+	+	+	+	19
_	_	+	_	+	_	+	+	+	+	20
_	_	+	_	+	_	+	+	+	+	21
+	_	+	_	+	_	+	+	+	+	22
+	_	+	_	+	_	+	+	+	+	23
_	_	+	_	+	_	+	+	+	+	24
+	_	+	_	+	+	+	+	+	+	25
+	_	+	_	+	_	+	+	+	+	26
+	_	+	_	+	_	+	+	+	+	27
_	_	+	_	+	_	+	+	+	+	28
_	_	+	_	+	_	+	+	+	+	29
_	_	+	_	+	_	+	+	+	+	30
_	_	+	_	+	_	+	+	+	+	31

_	_	+	_	+	_	+	+	+	+	32
_	_	+	_	+	_	+	+	+	+	33
_	_	+	_	+	_	+	+	+	+	34
_	_	+	_	+	_	+	+	+	+	35
_	_	+	_	+	_	+	+	+	+	36

SS: اختبار الكشف عن الـ *Salmonella* على وسط Agar *Shigella* *Salmonella*، BA: اختبار الكـشف عن الـ *Salmonella* على وسط Bismuth Sulphite Agar ، HA: اختبار الكشف عن الـــ *Salmonella* على وسط Hektoen Agar، TSI: اختبار الكشف عن الـ *Salmonella* على وسط (Triple Suger Iron Agar)، IND: اختبار الأندول، MR : اختبار أحمر الميتيل، VP: اختبار فـوكس بروسـكار، CIT: اختبـار سيمون سيترات ، URE : اختبار اليوريا، ONPG: اختبار O-Nitrophenyl – β-D- galactopyranoside.

كانت نتائج الاختبارات على الاوساط الانتقائية موجبة لوجود الـــ *Salmonella*، فنتيجــة الـــ *Salmonella* على الأوساط SS, BA, HA, TSI, MR تكون موجبة أما على الأوساط VP, URE فتكون سالبة، و تكون بعض الأنواع موجبة و البعض الآخر سالبة على الأوســاط IND, CIT, ONPG.

تظهر الصورة رقم (3) نمو مستعمرات الـ *Salmonella* على وسط SS Agar (شفافة من لون الوسط مع أو بدون مركز أسود). و هو أحد الأوساط الانتقائية للسالمونيلا.



الصورة (3) مستعمرات الـ *Salmonella* على وسط SS Agar

تظهر الصورة (4) الاختبارات التالية:

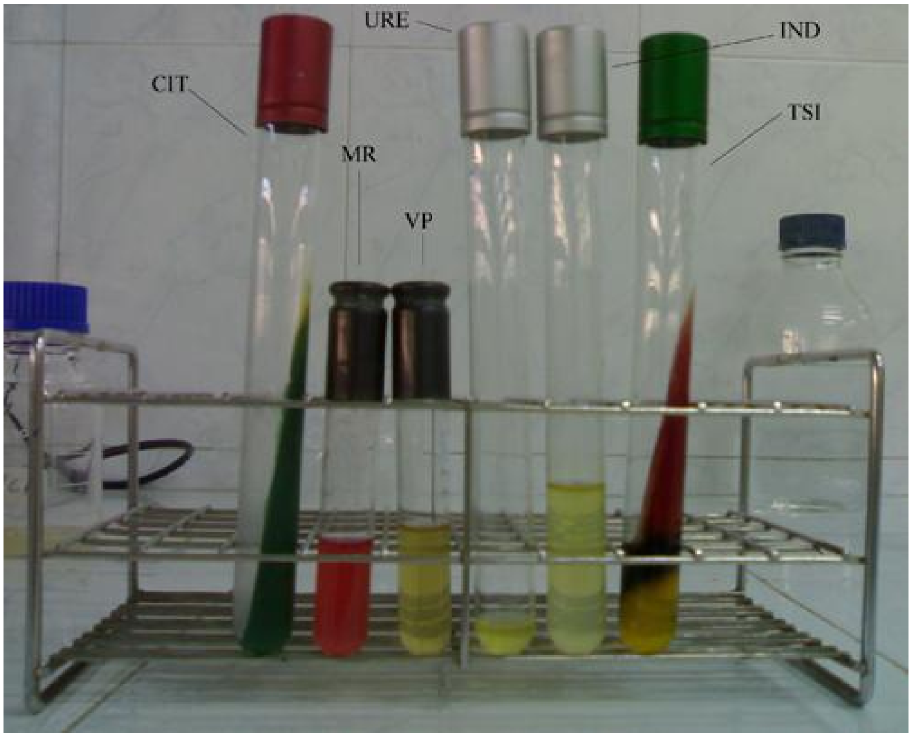
اختبار تخمير بعض السكاكر TSI: تعطي الـ *Salmonella* على وسط TSI لـون أحمـر علـى السطح المائل وأصفر في القسم العميق من البيئة، مع إعطاء اللون الأسود نتيجة تكـوين غـاز H_2S.

اختبار الأنـدول IND: عدم ظهور الحلقة الحمراء وبقاء الوسط بلون أصـفر يـدل علـى سـلبية الاختبار، قد تكون الـ *Salmonella* موجبة أو سالبة لاختبار الأندول.

اختبار اليوريا URE: بقاء اللون الأصفر للوسط دليل على تواجد الـ *Salmonella*.

اختبار أحمر الميتيل MR: يدل تحول لون الوسط إلى اللون الأحمر إلى نمو الـ *Salmonella*.
اختبار فوكس بروسكار VP: بقاء الوسط باللون الأصفر دليل على تواجد الـ *Salmonella* فهي سلبية لهذا الاختبار

اختبار سيمون سيترات CIT: بقاء اللون الأخضر دليل على سلبية الاختبار أما تحولـه لـلأزرق فهو دليل على إيجابية الاختبار، قد تكون الـ *Salmonella* موجبة أو سـالبة لاختبـار سـيمون سيترات.



الصورة (4) نتائج اختبارات الـ *Salmonella* علـى الأوسـاط TSI، IND ، URE، VP، MR، CIT.

يبين الجدول (21) نتائج تقنية الـــ API 20 E في تحديد هوية العـــزلات التـــي اعطـــت نتـــائج نموذجية للـــ *Salmonella* على البيئات الانتقائية وفي الاختبارات الأولية التـــي وضـــحت فـــي الجدول (20).

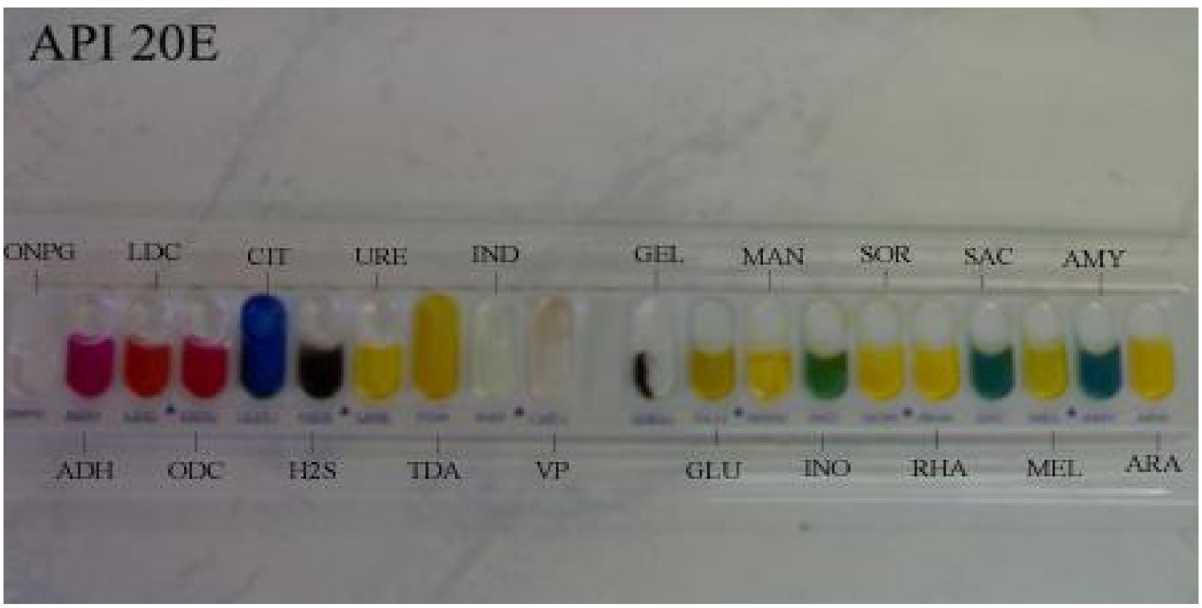
جدول (21) نتائج العزلات على صفيحة الـــ API

ARA	AMY	MEL	SAC	RHA	SOR	INO	MAN	GLU	GEL	VP	IND	TDA	URE	H2S	CIT	ODC	LDC	ADH	ONPG	رقم السلالة	نوع الـ *Salmonella*
+	_	+	_	+	+	_	+	+	_	_	_	_	_	+	+	+	+	+	_	1	*Salmonella spp*
+	_	+	_	+	+	_	+	+	_	_	+	_	_	+	+	+	+	+	+	2	*S.arizonae*
+	_	+	_	+	+	+	+	+	_	_	_	_	_	+	+	+	+	_	_	3	*S. paratyphi A*
+	_	+	_	+	+	+	+	+	_	_	_	_	_	+	+	+	+	+	_	4	*Salmonella spp*
+	_	+	+	+	+	+	+	+	_	_	_	_	_	+	+	+	+	+	_	5	*S.arizonae*
+	_	+	_	+	+	+	+	+	_	_	_	_	_	+	+	+	+	+	_	6	*Salmonella spp*
+	_	+	_	+	+	+	+	+	_	_	_	_	_	+	+	+	+	+	_	7	*Salmonella spp*
+	_	+	_	+	+	+	+	+	_	_	_	_	_	+	+	+	+	+	_	8	*Salmonella spp*
+	_	+	+	+	+	_	+	+	_	_	_	_	_	+	+	+	+	+	+	9	*S.arizonae*
+	_	+	_	+	+	+	+	+	_	_	_	_	_	+	+	+	_	+	_	10	*Salmonella spp*
+	_	+	+	+	+	+	+	+	_	_	_	_	_	+	+	+	+	+	_	11	*S.arizonae*
+	_	+	_	+	+	+	+	+	_	_	_	_	_	+	+	+	_	+	_	12	*Salmonella spp*
+	+	+	_	+	+	+	+	+	_	_	_	_	_	+	+	+	+	+	+	13	*S.arizonae*
+	_	+	_	+	+	+	+	+	_	_	_	_	_	+	+	+	_	+	_	14	*Salmonella spp*
+	+	+	_	+	+	_	+	+	_	_	_	_	_	+	+	+	+	+	+	15	*S.arizonae*
+	_	+	+	+	+	_	+	+	_	_	_	_	_	+	+	+	+	+	+	16	*S.arizonae*
+	_	+	_	+	+	+	+	+	_	_	_	_	_	+	+	+	+	+	_	17	*Salmonella spp*
+	_	+	_	+	+	_	+	+	_	_	_	_	_	+	+	+	+	+	_	18	*Salmonella spp*
+	_	+	_	+	+	_	+	+	_	_	_	_	_	+	+	+	+	+	_	19	*Salmonella spp*
+	_	+	_	+	+	_	+	+	_	_	_	_	_	+	+	+	+	+	_	20	*Salmonella spp*
+	_	+	_	+	+	+	+	+	_	_	_	_	_	+	+	+	+	+	_	21	*Salmonella spp*
+	+	+	_	+	+	+	+	+	_	_	_	_	_	+	+	+	+	+	+	22	*S.arizonae*
+	+	+	_	+	+	_	+	+	_	_	_	_	_	+	+	+	+	+	+	23	*S.arizonae*
+	_	+	_	+	+	+	+	+	_	_	_	_	_	+	+	+	+	+	_	24	*Salmonella spp*
+	_	+	_	+	+	_	+	+	_	_	+	_	_	+	+	+	+	+	+	25	*S.arizonae*
+	_	+	+	+	+	_	+	+	_	_	_	_	_	+	+	+	+	+	+	26	*S.arizonae*
+	_	+	+	+	+	_	+	+	_	_	_	_	_	+	+	+	+	+	+	27	*S.arizonae*
+	_	+	_	+	+	_	+	+	_	_	_	_	_	+	+	+	_	+	_	28	*S. paratyphi A*
+	_	+	_	+	+	_	+	+	_	_	_	_	_	+	+	+	+	+	_	29	*Salmonella spp*
+	_	+	_	+	+	_	+	+	_	_	_	_	_	+	+	+	_	+	_	30	*S. paratyphi A*
+	_	+	_	+	+	_	+	+	_	_	_	_	_	+	+	+	+	+	_	31	*Salmonella spp*
+	_	+	_	+	+	_	+	+	_	_	_	_	_	+	+	+	+	+	_	32	*Salmonella spp*
+	_	+	_	+	+	_	+	+	_	_	_	_	_	+	+	+	_	+	_	33	*S. paratyphi A*
+	_	+	_	+	+	+	+	+	_	_	_	_	_	+	+	+	+	+	_	34	*Salmonella spp*
+	_	+	_	+	+	_	+	+	_	_	_	_	_	+	+	+	_	+	_	35	*S. paratyphi A*
+	_	+	_	+	+	_	+	+	_	_	_	_	_	+	+	+	+	+	_	36	*Salmonella spp*

حيث: ONPG: اختبار (O-Nitrophenyl – β-D- galactopyranoside)، ADH: اختبار تفكيك الأرجنين.، LDC: اختبار تفكيك الليزين.، ODC: اختبار تفكيك الأورنثين. CIT: اختبار سيمون سـيترات. H_2S: اختبـار انتاج غاز كبريت الهيدروجين. URE: اختبار تفكيك اليوريا. TDA: اختبار تفكيك التربتوفـان. IND: اختبـار الأندول. VP: اختبار فوكس بروسكار. GEL: اختبار تفكيك الجيلاتين. GLU: اختبار تخمير سكر الغلوكـوز. MAN: اختبار تخمير سكر المانيتول. INO: اختبار تخمير سكر الإنوسـيتول. SOR: اختبـار تخميـر سـكر السوربيتول. RHA: اختبار تخمير سكر الرامنوز. SAC: اختبار تخمير سكر السكروز. MEL: اختبار تخميـر سكر الميليبيوز. AMY: اختبار تخمير سكر الأميغدالين. ARA: اختبار تخمير سكر الأرابينوز.

يظهر من الجدول (21) تطابق نتائج طرق العزل التقليدية على الأوساط الانتقائية مع تقنيـة الـــ API، لكن باستخدام صفيحة الـ API يمكن تحديد بعض الأنواع إضافة للكـشف عـن الجـنس البكتيري (*S. paratyphi A, S. Arizonae*).

تظهر الصورة (5) الاختبارات الموجودة في صفيحة الـ API 20E و المـذكورة فـي الجـدول (21) وتدل على بكتيريا *Salmonella spp*.



الصورة (5) نتائج اختبار الـ *Salmonella* على صفيحة الـ API 20E.

يبين الجدول (22) توزع أنواع الـــ *Salmonella* والتي تم الكشف عنها باستخدام تقنية الـــ API في أجزاء الفروج و في الشاورما حسب المناطق و فصول السنة.

جدول (22) تواجد أنواع الـــ *Salmonella* في الفروج ومنتجاته

رقم العينة	نوع العينة	مكان الجمع	تاريخ الجمع	فصل السنة	نوع الـــ *Salmonella*
1	أحشاء	باب السريجة	5/2007	ربيع	*Salmonella spp.*
2	أحشاء	جرمانا	5/2007	ربيع	*S. arizonae*
3	أحشاء	الطبالة	5/2007	ربيع	S. paratyphi A
4	أحشاء	مزة جبل	6/2007	ربيع	*Salmonella spp.*
5	أحشاء	جرمانا	10/2007	خريف	*S. arizonae*
6	أحشاء	باب مصلى	11/2007	خريف	*Salmonella spp.*
7	جناح	المزة	6/2007	ربيع	*Salmonella spp.*
8	رقبة	سوق الهال	8/2007	صيف	*Salmonella spp.*
9	رقبة	برزة	10/2007	خريف	*S. arizonae*
10	رقبة	باب السريجة	11/2007	خريف	*Salmonella spp.*
11	شاورما دجاج	برزة	4/2007	ربيع	*S. arizonae*
12	صدر	مساكن برزة	8/2007	صيف	*Salmonella spp.*
13	صدر	الزبلطاني	2/2008	شتاء	*S. arizonae*
14	صدر	مساكن برزة	3/2008	شتاء	*Salmonella spp.*
15	طحال	كشكول	10/2007	خريف	*S. arizonae*
16	طحال	باب الجابية	7/2007	صيف	*S. arizonae*
17	طحال	باب السريجة	7/2007	صيف	*Salmonella spp.*
18	طحال	باب مصلى	7/2007	صيف	*Salmonella spp.*
19	طحال	سوق الهال	7/2007	صيف	*Salmonella spp.*
20	ظهر	مساكن برزة	8/2007	صيف	*Salmonella spp.*
21	ظهر	التل	11/2007	خريف	*Salmonella spp.*
22	ظهر	مساكن برزة	10/2007	خريف	*S. arizonae*
23	فخذ	الزبلطاني	6/2007	ربيع	*S. arizonae*
24	فخذ	المزة	6/2007	ربيع	*Salmonella spp.*
25	فخذ	سوق الهال	6/2007	ربيع	*S. arizonae*

S. arizonae	ربيع	6/2007	مساكن برزة	فخذ	26
S. arizonae	ربيع	6/2007	مساكن برزة	فخذ	27
S. paratyphi A	صيف	9/2007	باب الجابية	قلب	28
Salmonella spp.	صيف	9/2007	جرمانا	قلب	29
S. paratyphi A	صيف	9/2007	الدويلعة	قلب	30
Salmonella spp.	صيف	9/2007	كشكول	قلب	31
Salmonella spp.	صيف	9/2007	مساكن برزة	قلب	32
S. paratyphi A	صيف	9/2007	المزة	كبد	33
Salmonella spp.	صيف	9/2007	باب الجابية	كبد	34
S. paratyphi A	صيف	9/2007	كشكول	كبد	35
Salmonella spp.	صيف	9/2007	مساكن برزة	كبد	36

يُلاحظ من الجدول السابق أن *S. paratyphi A* تواجدت في كل من الأحشاء والقلب والكبد فقط. بينما تكرر تواجد *S. arizonae* في الأحشاء والرقبة والصدر والفخذ والطحال والظهر وفي الشاورما.

يبين الجدول (23) النسب المئوية لتواجد أنواع الـ *Salmonella* التي تم الكشف عنها بتقنية الـ API في العينات المدروسة.

جدول (23) النسب المئوية لتواجد أنواع الـ *Salmonella* في الفروج

النسبة المئوية لتواجدها	عدد العينات الملوثة	نوع الـ *Salmonella*
13.89	5	*S. paratyphi A*
33.33	12	*S. arizonae*
52.78	19	*Salmonella spp*

تكرر ظهور *S. arizonae* في اثنتي عشرة عينة من بين العزلات الست وثلاثين المستحصل عليها من العينات المئة والخمسين المدروسة. بينما تكرر ظهور *S. paratyphi A* في خمس عينات فقط. ولم يتم التعرف على نوع الـ *Salmonella* في تسع عشرة عزلة باستخدام صفيحة الـ API.

نستنتج أن نسبة تواجد السالمونيلا في العينات المدروسة 41% و كان النوع *S.arizonea* هو الأكثر تكراراً. وشكل 33.3% من الإصابات. بالمقارنة مع الدراسة التي أُجريت على لحوم الدواجن النيئة المداولة في السوق الأوربية وُجد أن حوالي 34.8% من العينات المدروسة كانت ملوثة ببكتيريا تنتمي للجنس *Salmonella* وقد وجد أنها من 11 نوع مختلف، إلا أن النوع *S. muenchen* كان الأكثر تكراراً (Banwart, 1989). أما في فنزويلا فقد شكلت نسبة الإصابة حوالي 90% من العينات المدروسة وقد كان النوع السائد فيها هو النوع *S.anatum* (Hui *et al.*, 1995) وهذا مخالف للدراسة التي تم إجراؤها على عينات الفروج في منطقة دمشق وريفها.

4 -3 نتائج تقنية الـ PCR: The results of PCR technique

تم تحديد العزلات الست وثلاثين التي أعطت نتائج نموذجية على البيئات الانتقائية والاختبارات الموضحة بالجدول (20) والتي تعتبر أنها تتبع لجنس الـ *Salmonella* بالاستعانة بتقنية PCR باستخدام المرئسين – الموضحين بالجدول (11) – بالاعتماد على المورثة *16sRNA* كمورثة ثابتة بالجنس (Lee *et al.*, 2003).

تظهر الصورة (6) نتائج 16 عزلة باستخدام تقنية الـ PCR، إضافة لشاهد سلبي (*Escherichia coli*) وإيجابي (*Salmonella typhi* SO9)، وعلى الجانب الأيمن من الصورة أطوال الشدفات في عياري الوزن الجزيئي للـDNA. وتظهر العينات ذات الأرقام (1,2,3,7,9,11,13,15,18,19,23,24,27,30,33,35) و التي انفصلت عند طول شدفة قدرها 290. و هي نفس الطول التي انفصل عندها الشاهد الإيجابي للـ *Salmonella*.



الصورة (6) نتائج الرحلان الكهربائي لنواتج الـ PCR باستخدام المرئسات S، AS والتي تحدد الجنس.

4-4 - نتائج المقارنة بين تقنيتي الـ API والـ PCR:
The results of comparisons between PCR and API techniques

لُوحظ لدى مقارنة نتائج الكشف عن وجود الـ *Salmonella* في العينات المدروسة باستخدام تقنيتي الـ API والـ PCR، وجود توافق نتائج الكشف عن الـ *Salmonella* في 35 عزلة واختلافهما في عزلة وحيدة هي العزلة 18. أي أن نسبة التوافق في نتائج الكشف عن الـ *Salmonella* بين تقنيتي الـ API والـ PCR في 97.2% من العزلات المدروسة. وذلك مقارب للدراسة التي تم إجراؤها من قبل العالم Daniele و زملاؤه عام 2006 في الولايات المتحدة الأمريكية على عينات مأخوذة من مزارع الخنزير، فكانت 125 منها موجبة لوجود السالمونيلا باستخدام صفيحة الـ API 20E، بينما كانت 124 منها موجبة باستخدام تقنية الـ PCR، أي أن نسبة التوافق كانت 99.2%.

يمكن استخدام كلا الطريقتين للحصول على نفس النتائج تقريباً، ويعتمد الاختيار بينهما على التكلفة، فتعد طريقة الـ API الأكثر تكلفة مقارنة مع تقنية الـ PCR، بينما تمتاز طريقة الـ API بإمكانية إجراء كل اختبار بشكل مستقل. فتعد طريقة الـ API أكثر اقتصادية في المخابر الصغيرة ذات الجهيزات المحدودة و عدد العينات قليل، أما في المخابر ذات التجهيزات الجيدة و عدد العينات الكبير فإن تقنية الـ PCR تعد أكثر اقتصادية. إضافة لذلك فإنه باستخدام تقنية الـ PCR يتم الحصول على النتائج خلال ساعات من عزل السالمونيلا على الأوساط

الانتقائية، أو حتى أوساط الإغناء. و تكون النتائج أكثر وضوحاً مع تقليل تـــأثير عامـــل الخطـــأ الشخصي مقارنة مع طريقة الـــ API. كون تقنية الــ API طريقة لونية تعتمد على ردود أفعـــال السلالات المدروسة تجاه الاختبارات الحيوية البيوكيميائية والتي تتأثر بـــبعض شـــروط الوســـط المحيطة، في حين تعتمد تقنية الـــ PCR على تضخيم قطعة محددة من المادة الوراثية مما يجعلها الأكثر دقة في العمل وبخاصة في المخابر المتخصصة بهذه التقنية في حال الحصول على مرئس موثوق لتحديد النوع. يمكن استخدام طريقة الـــ API للكشف عن الجنس و عدة أنواع بينما تقنية الـــ PCR لكل منها برايمر خاص (Daniele *et al.*, 2006). من جهة ومن جهة أخـــرى فـــإن هذه التقنية يمكن اعتمادها عند الحاجة إلى التركيز على تواجد وعدم تواجد الـــ *Salmonella* في العينات لاسيما الغذائية منها وذلك للسماح بتداول المواد الغذائية كما يحدث في سوريا حيـــث يـــتم فقط الاعتماد على تواجد جنس الـــ *Salmonella* في الأغذية دون البحث عـــن النـــوع لـــرفض العينات ومخالفتها تبعاً للمواصفة القياسية السورية – الاشـــتراطات الـــصحية رقـــم 2179 لعـــام 2007، في حين أنه يمكن تطبيق تقنية الـــ API لإعطاء فكرة أولية عن الأنواع المتواجـــدة فـــي العينات الغذائية المدروسة بالرغم من حاجتها إلى عدة أيام للحصول على النتيجة إلا أنهـــا تقنيـــة يمكن اعتمادها في المخابر غير المتخصصة.

5 - الاستنتاجات: Conclusions

1- بلغت نسبة عينات الفروج الملوثة بالــ *Salmonella* 41%.

2- أكثر أجزاء الفروج تلوث بالــ *Salmonella* هي الأحشاء بنسبة 60%.

3- بلغت نسبة المناطق الملوثة بالــ *Salmonella* والتابعة لمدينة دمشق 52.2%، في حين بلغت نسبة المناطق الملوثة التابعة لريف دمشق 18.2%.

4- أكثر الأنواع التابعة لجنس الــ *Salmonella* انتشاراً هو النوع *S. arizonae*، و بشكل أقل النوع *S. paratyphi A*.

5- لم يتم الكشف عن نوع 52.78% من العزلات الناتجة والتابعة لجنس الــ *Salmonella* في العينات باستخدام تقنية الــ API.

6- توافق نتائج الكشف عن الــ *Salmonella* بين تقنيتي الــ API والــ PCR في 97% من العزلات المدروسة. كونهما اختبارين معتمدين ودقيقين.

6 - المقترحات: Suggestions

1- الاهتمام بنظافة الفروج ابتداءً من المزرعة (كتعقيم العلف وتبديل الفرشة بين كل قطيع وآخر) ومروراً بالجمع والنقل وحتى عملية الذبح بما فيها من تعقيم للأدوات بين كل عمليتي ذبح وغسيل الفراريج كل منها على حدة (بدون استخدام أحواض الغسيل التي قد تنقل التلوث) وثم التغليف كي نقلل من التلوث التصالبي. وانتهاءً بمطبخ المستهلك ونظافة الأشخاص. والعمل على إجراء اختبارات دورية للعاملين في هذا المجال لتقليل التلوث الناتج عن العمال.

2- توسيع نطاق الدراسة لتشمل محافظات أخرى ومقارنتها مع النتائج في محافظة دمشق وريف دمشق. وتتبع الإصابة لمعرفة المصادر الأساسية لها.

3- متابعة الدراسة على أنواع الــ *Salmonella* في منتجات أخرى كالحليب ومنتجاته ومقارنة النتائج بين تقنيتي الــ API والــ PCR.

4- تطبيق دراسة مشابهة على أجناس بكتيرية أخرى كالــ *Listeria* و *Staphylococcus* وغيرها.

5- استخدام تقنية الــ PCR في الكشف عن الــ *Salmonella* لأنها ذات نوعية وحساسية عاليتين لاعتمادها على مورثات محافظة ضمن المادة الوراثية للبكتيريا. كما يستحسن استخدامها للكشف عن الأنواع و تحت الأنواع لقدرتها على الكشف عنها باستخدام المرئسات المناسبة.

المراجع
References

المراجع العربية:

- إحصائيات واستمارات المركز الوطني للمعلومات السمية للأعوام (2001 – 2002).
- الشايب اسماعيل عيسى (2002) "الأمراض المنقولة بواسطة الغذاء"، تأليف دين أوكلايفر، ترجمة محمد الدقل، مطابع جامعة الملك سعود (الرياض). 11: 293 – 303.
- المنلا، عبد الله (1996) "علم الأمراض المشتركة بين الإنسان و الحيوان" منشورات جامعة البعث . 70 – 73
- حسين، السيد صالح ربيع (1997) "الأمراض التي تنتقل من الحيوان إلى الإنسان" النشر العلمي و المطابع – جامعة الملك سعود- المملكة العربية السعودية. 47 – 51.
- حسين، محمد (2004) "مهام الرقابة الصحية على اللحوم في العدوى والتسمم الغذائي" ArabVet 18 (21):1- 6.
- شحاتة، عبده (1999) "الأمراض المنتقلة الناتجة عن الغذاء" المكتبة الأكاديمية، القاهرة 127-132.
- عبيد، ميخائيل، (1997) "علم الجراثيم " جامعة دمشق – كلية الصيدلة. 64 – 71.
- غنيم، سمير (1996) "التسمم الغذائي الحاد والتسمم طويل المدى" دار الجيل، بيروت. 61 – 68.

English References:

- Alban L., Stege H. and Dahl J. (2002) " The new classification system for slaughter-pig herds in the Danish *Salmonella* surveillance-and-control program" Preventive Veterinary Medicine.53(2):133-146.
- Alocilja EC. and Radke SM. (2003) "Market analysis of biosensors for food safety" Biosens Bioelectron. 18 (6):841-6.
- AOAC international 2000 "official methods of analysis, 17^{th} ed." Methodes, Gaithersburg MD.
- Arnedo A., Bellido JB., Pac MR, Criado J., Usera MA., Mesanza I., Gonzalez F, Perez R. and Cortes JM. (1998) "Epidemic outbreaks of salmonellosis caused by eating eggs" Inf. Microbiol Clin. .16(9):408-412.

- Banwart GJ. (1989) "Salmonellosis - Basic food microbiology 2nd ed" Chapmon and Hall. 248 – 274.
- Bäumler A.J., Hargis B.M .and Tsolis R.M. (2000) "Tracing the origins of *Salmonella* outbreaks" Science 287:50 –52.
- Bej AK., Mahbubani MH., Dicesare JL. and Atlas RM. (1991) "Polymerase chain reaction-gene probe detection of microorganisms by using filter-concentrated samples" Appl Environ Microbiol.57(12):3529-34.
- Blaha T. (2003) "Implementing a *Salmonella* monitoring programme for pork in Germany " International Symposium on Epidemiology and control of Foodborne pathogens. 200-202.
- Blaha T. (2004) "Up- To- Date information from the German QS *Salmonella* monitoring and reduction programme" Dtsch tierarztl wochenschr. 111(8):324-326.
- Blumenthal D. (1990) "*Salmonella* enteritidis. From the chicken to the egg" U.S. Department of Health and Human Services, Wahington, D.C. 230- 299.
- Brooks K A., Jeno M. and Sodeman T M. (1974) "Clinical evaluation of the API microtube system for identification of Enterobacteriaceae" Med. Technol. 40:55-61.
- Brooks BW., Devenish J., Lutze-Wallace CL, Milnes D., Robertson RH. and Berlie-Surujballi G. (2004) "Evaluation of a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of Campylobacter fetus in bovine preputial washing and vaginal mucus samples" Vet Microbiol. 103(2):77-84.
- Brown K., Caruso N.S., Casolari A. and Ekund T. (1996) "Micro-organisms in foods 5th ed" Blackie academic and professional. London. 221 - 252 .
- Bryan F L. (1980) "Control of foodborne diseases, in safety foods" Publishing, Westport. 17-23.
- Burrows W. (1985) "Burrows Textbook of Microbiology 22nd ed. Sunders, Phildelphia. 95-102.
- CDC (Centres for Disease Control and Prevention) (2005) "*Salmonella Surveillance:* Annual Summary 2004" US Department of Health and Human Services Atlanta, Georgia.
- Chiu CH., Tang P., Chu C., Hu S., Bao Q., Yu J., Chou YY., Wang HS. and Lee YS. (2005) "The genome sequence of *Salmonella* enterica serovar Choleraesuis, a highly invasive and resistant zoonotic pathogen" J.Nucleic Acids Res. 33 (5):1690-1698.

- Crespo PS., Hernandez G., Echeita A., Torres A., Ordonez P. and Aladuena A. (2005) "Surveillance of foodborne disease outbreaks associated with consumption of eggs and egg products" Euro Surveill. 10: 61 - 62.
- Daniele M., Nucera., Carol W., Maddox, Patricia Hoien-Dalen. and Ronald M. Weigel (2006) "Comparison of API 20E and invA PCR for Identification of *Salmonella enterica* Isolates from Swine Production Units" JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY. American Society for Microbiology Vol. 44, No. 9 p. 3388–3390.
- D'Aoust JY. (1989) *"Salmonella*' In Doyle M.P. foodborne bacterial pathogens" Marcel Dekker Inc. New – York. P. 327-445.
- DHS (Department of Health Services) (2000) "*Salmonella* heidelberg associated with bakery- purchasded tres leches caks" Los Angeles countyt
- Edwards RA., Matlock BC., Heffernan BJ. and Maloy SR. (2001) "Genomic analysis and growth-phase-dependent regulation of the SEF14 fimbriae of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis" Microbiology. 147:2705-2715
- Eley AR., (1993) "Microbial Food Poisoning – infective bacterial food poisoning 2nd ed". Chapman and Hall 2:14 – 21.
- Euzéby JP. (1999) "Revised *Salmonella* nomenclature: designation of *Salmonella* enterica (ex Kauffmann and Edwards 1952)" Int. J. Syst. Bacteriol. 49:927-930.
- Fang FC., and Fierer J. (1991) "Human infection with *Salmonella dublin*". Medicine 70**:**198-207.
- Farmer JJ. (1995) "*Enterobacteriaceae:* introduction and identification. 6th ed." American Society for Microbiology, Washington. 438- 449
- Feachem RG., Bradley DJ., Garelick H., Marar DD. (1983) "*Salmonella enteric* fevers and Salmonellosis" Chichester, London 251 – 286.
- Finlay BB., Fey J. and Rock EP. (1989) "Passage of *Salmonella* through polarized epithelial cells" Role of the host and bacterium. J. cell Sci Suppl. 11:99-107.
- Fratamico PM. (2003) "Tolerance to stress and ability of acid-adapted and non-acid-adapted *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 to invade and survive in mammalian cells in vitro" J Food Prot. 66(7):1115-1125

- Funk SA., Davies PR. and Nichols MA. (2000) "the effect of fecal sample weight on detection of *Salmonella enterica* in swine faeces" J. vet. Diagn invest. 12(5):412-418.
- Gaillot O., Clément C., Simonet M. and Philippon A. (1997) "Novel transferable -lactam resistance with cephalosporinase characteristics in *Salmonella enteritidis*" Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 39: 85–87.
- Gillespie IA., O'Brien SJ., Adak GK., Ward LR. and Smith HR. (2005) "Foodborne general outbreaks of *Salmonella* Enteritidis phage type 4 infection, England and Wales, 1992–2002: where are the risks" Epidemiol. Infect. 133:795–801.
- Guthrie RK. (1992) "*Salmonella – Salmonella enteritidis* in eggs" Crc pres inc, united states. 117- 130.
- Hui YH., Gorham RJ., Murrell K D. and Cliver O Dean. (1995) "Food borne disease handbook – *Salmonella*. volume 1". Marcel Dekker, Inc. 9:253 – 291.
- Humphrey T. (2000) "Public-health aspects of *Salmonella* infection. In: C. Wray and A. Wray, Editors, *Salmonella* in Domestic Animals" CABI Publishing, London : 245–263.
- ISO 6579: (2002) "Microbiology – General guidance on methods for the detection of *Salmonella*" International Organization for standardization, Geneva, Switzerland.
- Iwade Y., Tamura K., Yamouchi A., Kumazwa NH. and Sugiyama R. (2005) "characterization of the Outbreak – Derived *Salmonella enterica* Serover Enteritidis strains with atypical triple sugar iron and simmons citrate reactions" laboratory and epidemiology communications. 65-67
- Jacobsen C. S. and. Holben W. E (2007) "Quantification of mRNA in *Salmonella* sp. seeded soil and chicken manure using magnetic capture hybridization RT- PCR" Journal of Microbiological Methods 69 (2):315-321.
- Jay JM. (1996) "Modern food Microbiology – 5th ed" Chapman and Hall New- York. 478 – 520.
- Jones YE., Mclaren IM. and Wray C. (2000) "Laboratory aspects of *Salmonella*" CABI publishing, Wallingford, United Kingdon. 393 – 405.
- June GA., Sherrod PS., Hammack TS., Amaguana RM. and Andrews WH. (1995) "Relative effectiveness of selenite cystine broth, tetrathionate broth, and Rappaport-Vassiliadis medium for the recovery of *Salmonella* from raw flesh and other highly

contaminated foods: Precollaborative study" J. AOAC Int. 78:375-380.

- Keller LH., Schifferli DM., Benson CE., Aslam S. and Eckroade RJ. (1997) "Invasion of chicken reproductive tissues and forming eggs is not unique to *Salmonella enteritidis*" Avian Dis. 41 : 535–539.
- Lazcka O., Delcampo T. and Munoz FX. (2006) "Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosenors" Bioelectronics. 22(7): 1205-1217.
- Le Minor L. (1984) "The genus *Salmonella*" Springer – Verlag, New – York . 1148 – 1159.
- Lee CY., panicker G. and Bej AK. (2003) "Detection of pathogenic bacteria in shellfish using multiplex PCR followed by covalink NH microwell plate sandwish hybridization" Journal of microbiological methods 53: 199-209.
- Leonard P., Hearty S., Brennan J., Dunne L., Quinn J., Chakraborty T. and O‘ Kennedym R. (2003) "Advances in biosensors for detection of pathogens in food and water". Enzyme and Microbial Technology. 32: 3-13
- Leoni E. and Legnani PP. (2001) "Comparison of selective procedures for isolation and enumeration of Legionella species from hot water systems" J Appl Microbiol. 90(1):27-33.
- Levinson W. and Jawetz E. (2002) "Medical microbiology and immunology examination and board review 7th ed. 45- 49.
- Malorny B., Bunge C. and Helmuth R. (2007) "A real-time PCR for the detection of *Salmonella* Enteritidis in poultry meat and consumption eggs" Journal of Microbiological Methods 2:113–117.
- Marg H., Scholz HC., Arnold T., Rösler U. and Hensel A. (2001) "Influence of long transportation stress on re-activation of *Salmonella* Typhimurium DT 104 in experimentally infected pigs" Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr. 113 : 385–388.
- Marino A., Lombardo L., Fiorentino C., Orlandella B., Monticelli L. and Nostro A. (2005) "Uptake of *Escherichia coli, Vibrio cholerae* non-ol and *Enterococcus durans* and depuration of mussels (*Mytilus galloprovincialis*)" International Journal of Food Microbiology 99:281–286.

- Mead PS., Slutsker L., Dietz V., McCaig LF., Bresee JS., Shapiro C., Griffin PM. and Tauxe RV**.** (1999) "Food-related illness and death in the United States" Emerg. Infect. Dis. 5**:**607-625.
- Melba K., Varma J., Rossiter S., Lay J., Joyce K., Stamey K. and Angulo F. (2002) "Antimicrobial Resistance in *Salmonella* Serotype Typhimurium, R-Type ACSSuT, is Associated with Bacteremia: NARMS" International Conference on Emerging Infectious Diseases. Atlanta. 321-332.
- Moore J. (2003) "Comparison of phenotypic and genotypic characteristics of *Salmonella* bredeney associated with a poultry-related outbreak of gastroenteritis in Northern Ireland" Journal of Infection. 47(1): 33: 45.
- Murray B., Pfaller T. and Yolken A. (1999) "Manual of clinical microbiology 7th ed" American society for microbiology. 9: 212 224.
- Ng H., Bayne G. and Garibaldi JA. (2003) "Heat resistance of *Salmonella"* Appl. Microbiol. 17:78- 82.
- NMKL method no 71, 2ed (1999) "*Salmonella* Detection in food, Nordic committee on food analysis".
- Nord CE., Lindberg AA. and Dahlback A. (1974). "Evaluation of five test kits API, Auxo Tab, Enterotube, Patho Tech and R/B for identification of Enterobacteriaceae" Med Microbial. Immunol. 159:211-220.
- Nucera DM., Maddox CW., Dalen PH. and Weigel RM. (2006) "Comparison of API 20E and invA PCR for identification of *Salmonella enterica* isolates from Swine Production Units" J. Clin. Microbiol. 44(9): 3388 – 3390.
- Olsen S., Blackmore C., DeBess E., Marano N., Eby T., McGivern T., Krause G., Mauvais S., Balan V., Wiersma S., Cieslak P. and Angulo, F. (2000) "Emergence of fluoroquinoloneresistant *Salmonella* infections in the United States nosocomial outbreaks suggest a changing epidemiology" International Conference on Emerging Infectious
- Parker C T., Harmon B. and Guard-Petter J**.** (2002) "Mitigation of avian reproductive tract function by *Salmonella enteritidis* producing high-molecular-mass lipopolysaccharide" Environ. Microbiol. 4**:**538-545.

§ Pitcher DG. and Fry NK. (2000) "Molecular techniques for the detection and identification of new bacterial pathogens" J Infect. 40(2):116-20.

§ Polymenis HL., Rabsch W., Porwollik S., McClelland M., Rosetti C., Adams LG. and Bäumler AJ. (2004) "Host restriction of *Salmonella* enterica serotype Typhimurium pigeon isolates does not correlate with loss of discrete genes" J Bacteriol.186(9):2619-28.

§ Popoff MY., Bockemuhl J. and Hickman-Brenner FW. (2000) "Supplement (1998) (no. 42) to the Kauffmann-White scheme" Res. Microbiol. 151:63-65.

§ Post DE. (1997) "food borne pathogens monograph number I, *Salmonella*" Oxoid limited, Hampshire, England. 8: 104 -112.

§ Rahman MM., Guard-Petter J. and Carlson RW. (1997) "A virulent isolate of *Salmonella enteritidis*, *Salmonella enteritidis* produces a *Salmonella typhi*, *Salmonella typhi*-like lipopolysaccharide" J. Bacteriol. 179**:**2126-2131.

§ Rahn K., De Grandis SA., Clarke RC., McEwen SA., Galán JE., Ginocchio C., Curtiss R. and Gyles CL. (1992) “Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*" *Mol. Cell. Probes* 6 : 271–279

§ Robert Koch Institute, (2006) "Statistics of infectious diseases" Epidemiological Bulletin no. 50.

§ Rubin RH. and Weinstein L. (1997) "Salmonellosis: microbiologic, pathologic, and clinical features" Stratton Intercontinental, New York. 45: 17 -23.

§ Sackey BA., Mensah P., Collison E and Sakyi-Dawson E (2001) "Campylobacter, *Salmonella* , Shigella and Escherichia coli in live and dressed poultry from metropolitan accra" Int J Food Microbiol. 71(1):21-28

§ Sanchez J., Dohoo IR., Christensen J. and Rajic A. (2007) "Factors influencing the prevalence of *Salmonella spp*. in swine farms: A meta-analysis approach" Preventive Veterinary Medicine. 81(3):148-177.

§ Schmith RH. and Rodrick GE. (2003) "Food Safety Handbook" wiley-interscience Canada . 128 – 132.

§ Smith PB., Tomfohrdem KM., Rhoden DL. and Balows A. (1972). "API system: a multitube micromethod for identification of Enterobacteriaceae". Appl. Microbial. 24:449-452.

- Stevens KA. and Jaykus LA. (2004) "Bacterial separation and concentration from complex sample matrices: a review" Crit Rev Microbiol. 30(1):7-24
- Touron A., Berthe T., Pawlak B. and Petit F. (2005) "Detection of *Salmonella* in environmental water and sediment by a nested-multiplex polymerase chain reaction assay" Int J Food Microbiol 156(4):541-553
- USDA (United Departement of Agriculture) (2004) "Isolation And Identification of *Salmonella* From Meat, Poultry And Egg Products" USDA food safety inspection service.
- Ward LR., Threlfall J.,Smith HR and O'Brien SJ. (2000) *"Salmonella enteritidis* epidemic" Science 287:1753–1754.
- Waterman, S. H., G. Juarez, S. J. Carr, and L. Kilman. (1990). *Salmonella arizonae* infections in Latinos associated with rattlesnake folk medicine" Am. J. Public Health 80**:**286-289.
- Waters SM., Duffy CF and Power RFG. (2005) "PCR-DGGE analysis of cecal microflora of Natustat™-supplemented turkeys challenged with Histomonas meleagridis" Int. J. Poult. Sci. 4 (9):620–627.
- Wilcock BP. and Schwartz K. (1992) "Salmonellosis - Diseases in swine 7th ed" Iowa State University Press, Ames p. 570-583.
- Wolffs PFG., Glencross K., Norling B. and Griffiths MW. (2007) "Simultaneous quantification of pathogenic *Campylobacter* and *Salmonella* in chicken rinse fluid by a flotation and real-time multiplex PCR procedure" Int. J. Food Microbiology 117(1): 50-54.
- Woo PCY., Leung PKL., Leung KW. and Yuen KY. (2000) "Identification by 16S ribosomal RNA gene sequencing of an Enterobacteriaceae species from a bone marrow transplant recipient" J. Clin. Pathol. 53:211–215
- Wright J., Smith K., Tenglesen L., Grendon J., Boxrud D., Holland B. and Wright JG. (2002) "Outbreaks of Multidrug-Resistant *Salmonella Typhimurium* Infections in Humans Associated with Veterinary Facilities" Boston. 129 : 635–645.
- Yaron S. and Matthews KR. (2002) "A reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for detection of viable *Escherichia coli O157:H7*: investigation of specific target genes" J Appl Microbiol.;92(4):633-40.